COMMONWEALTH INST. OF ENTOMOLOGY LIBRARY
11 NOV 1948
SERIAL Eu. 86
SEPARATE

TIJDSCHRIFT OVER PLANTENZIEKTEN

JAARGANG 54 - 1948
4e AFLEVERING

Uitgave van de
NEDERLANDSE PLANTENZIEKTENKUNDIGE VERENIGING

Onder Redactie van
Prof. Dr W. K. J. ROEPKE; Mej. H. L. G. DE BRUYN; Dr J. A. A. M. H. GOOSSENS; Ir P. HUS en Dr A. J. P. OORT

Redactie-adres: Lab. v. Mycologie en Aardappelonderzoek, Wageningen

INHOUD

Blz.

Ir A. ROZENDAAL en Ir J. P. H. VAN DER WANT – Over de identiteit van het ratelvirus van de tabak en het stengelbontvirus van de aardappel. With a summary: On the identity of the rattle virus of tobacco and the stem-mottle virus of potato 113

Ir J. P. H. VAN DER WANT en Ir A. ROZENDAAL – Electronen-microscopisch onderzoek van het virus, dat de ratelziekte van de tabak en het stengelbont van de aardappel veroorzaakt. With a summary: An electron microscope study of the virus causing rattle disease of tobacco and stem-mottle of potato 134

Ir R. VAN DER VEN en Ir J. P. H. VAN DER WANT – Thielaviopsis basicola (Berk. et Br.) Ferraris als veroorzaker van een in Nederland nieuwe ziekte van de tabak. With a summary: Thielaviopsis basicola (Berk. et Br). Ferraris the cause of a tobacco disease, new for the Netherlands 142

IN MEMORIAM

Dr Pethybridge door H. M. Q. 146

BOEKBESPREKING

S. A. WAKSMAN – Microbial antagonisms and antibiotic substances (door H. M. Quanjer) 147

BESTUUR

VAN DE NEDERLANDSE PLANTENZIEKTENKUNDIGE VERENIGING

Prof. Dr Joha Westerdijk, Baarn, *voorzitster.*
Mej. Dr J. C. Went, Dalweg 10, Baarn, *secretaresse.*
Ir J. W. Seinhorst, Laboratorium voor Mycologie en Aardappelonderzoek, Wageningen, *penningmeester.* Postrekening no 346310 t.n.v. Penningm. Ned. Plantenziektenkundige Vereniging, Wageningen.
Ir C. W. C. van Beekom, Middelharnis.
Ir J. D. Gerritsen, Geldermalsen.
Dr A. D. Voute, Otterlo.
Dr D. J. Kuenen, Goes.

Lidmaatschap Ned. Plantenziektenkundige Vereniging

Nederland en Overzeese Gewesten f 5,—, België f 5,50 of 90 francs, Buitenland f 6,—. Leden ontvangen het tijdschrift gratis.

Abonnement Tijdschrift

Nederland en Overzeese Gewesten f 7,—, België f 7,— of 120 francs. Buitenland f 10,—. Betalingen op postrekening 346310 t.n.v. Penningmeester Ned. Plantenziektenkundige Vereniging te Wageningen. Voor België op Postrekening 115754 van de Heer G. Roland, ingenieur agronome te Gembloux.

Advertentiën

Prijzen per plaatsing: ⅛ pag. f 7,50, ¼ pag. f 12,50, ½ pag. f 20,—, 1 pag. f 35,—.
Bij 6 maal plaatsen van dezelfde advertentie 10 procent korting.
Voor plaatsing wende men zich tot H. Veenman en Zonen, Wageningen, tel. 2389.

AAN DE MEDEWERKERS VAN HET TIJDSCHRIFT

Om meer eenheid te brengen in de artikelen, korte mededelingen en referaten worden de schrijvers vriendelijk verzocht de volgende punten in acht te willen nemen:

1. Titel. Nederlandse titel, titel in de taal waarin de summary is gesteld, naam auteur, Laboratorium of Instelling waar auteur werkzaam is.
2. In de tekst auteursnamen dubbel te onderstrepen, Latijnse namen met slangetje. Verwijzing naar de literatuurlijst door middel van nummers tussen haakjes.
3. Summary. Verplicht voor de langere artikelen, gewenst voor de kortere mededelingen, bij voorkeur in de Engelse taal. Voor de korte mededelingen is een summary van enige regels meestal voldoende.
4. Literatuurlijst. Alfabetisch volgens auteurs te nummeren. Aanduiding tijdschrift zo beknopt mogelijk. Aanduiding deel, pagina als volgt: T. o. Plantenziekten 51: 37–49, 1945.
5. Honorarium f 1.— per blz. Voor korte mededelingen en referaten (hoogstens 4 blz.) f 1,50 per blz. De kosten van platen kunnen geheel of gedeeltelijk op het honorarium verhaald worden, indien de redactie dit wegens het aantal nodig oordeelt.
6. Bij het inzenden van het manuscript wordt men verzocht aan te geven of drukproef wordt verlangd. Schrijvers van grote artikelen ontvangen in ieder geval een drukproef, 25 overdrukken gratis. Indien meer overdrukken gewenst worden, gelieve men dit op het manuscript te vermelden.

NEDERLANDSE
PLANTENZIEKTENKUNDIGE (PHYTOPATHOLOGISCHE) VERENIGING

TIJDSCHRIFT OVER PLANTENZIEKTEN

Onder redactie van Prof. Dr W. K. J. ROEPKE; Mej. H. L. G. DE BRUYN; Dr J. A. A. M. H. GOOSSENS; Ir P. HUS en Dr A. J. P. OORT

Redactie-adres: Lab. voor Mycologie en Aardappelonderzoek, Wageningen
Drukkers-Uitgevers: H. Veenman en Zonen - Wageningen

54e JAARGANG (1948) 4e AFLEVERING JULI-AUG.

OVER DE IDENTITEIT VAN HET RATELVIRUS VAN DE TABAK EN HET STENGELBONTVIRUS VAN DE AARDAPPEL [1])

With a summary: On the identity of the rattle virus of tobacco and the stem-mottle virus of potato

DOOR

Ir A. ROZENDAAL en Ir J. P. H. VAN DER WANT

Laboratorium voor Mycologie en Aardappelonderzoek, Wageningen [2])

HET STENGELBONT VAN DE AARDAPPEL

In 1937 werd door de eerste van de schrijvers een aardappelziekte in studie genomen die zich buitengewoon raadselachtig voordeed. Het feit, dat de ziekte meest optrad bij slechts één of enkele stengels was voor de practijk aanleiding te spreken van stengelbont. In twee opzichten is deze naam echter min of meer misleidend, en wel, omdat gesuggereerd wordt, in de eerste plaats, dat het bont op de stengel zelf zou optreden, terwijl het om een bontheid van het blad gaat, en in de tweede plaats, dat geen volledig zieke planten zouden optreden. Het laatste kan wel degelijk het geval zijn.

Uit allerlei waarnemingen kon worden afgeleid, dat de ziekte alleen op bepaalde gronden (vaak zijn het slechts bepaalde gedeelten van percelen) uitbreekt. Het bleek hier om lichtere gronden en veengronden te gaan.

In de buitenlandse literatuur vindt men deze ziekte niet beschreven. Toch kan zij niet tot ons land beperkt zijn. Het optreden van de ziekte aan onze Oost- en Zuidgrens spreekt in dit opzicht voor zichzelf.

Dat het hier geen bacterie-, schimmel-, aaltjes- of gebreksziekte betreft, is o.a. besproken in een in 1947 verschenen publicatie (4).

De ziekteverschijnselen doen het meest denken aan die van een virusziekte. Hoewel in genoemde publicatie reeds uitvoerig op de ziektesymtomen is ingegaan, zal hier in het kort een en ander nog worden samengevat. Vooropgesteld dient te worden dat de aardappelrassen verschillend reageren. In principe kunnen bij een stengelbontzieke plant vier verschillende ziekteverschijnselen worden waargenomen:

[1]) Ontvangen voor publicatie Aug. 1948.

[2]) Onderzoek verricht voor de Landbouwhogeschool te Wageningen en voor de afdeling Tuinbouwkundig Onderzoek van de Directie van de Tuinbouw te 's-Gravenhage.

1. een bontheid; deze onderscheidt zich van het gewone mozaiek bij de aardappel door veel grovere vlekken en een gelere kleur; het zijn vaak gehele zônes die min of meer in de vorm van een boog dwars over de blaadjes heen lopen. Deze gedeelten blijven sterk in groei achter, waardoor het blad sterk gegolfd tot zeer misvormd kan worden. De niet gelige bladdelen zijn donkerder, harder groen van tint en glanzender dan normaal.
2. aucuba-achtige verschijnselen; in tegenstelling tot de min of meer ronde vlekken bij het gewone aucubabont doen hier de gele vlekjes zich in allerlei vorm voor, zodat met recht van figuur-aucubabont kan worden gesproken. In fig. 1 vertoont het linkse blad, afkomstig van een zieke Bevelander, deze figuurtjes zeer duidelijk; bij het rechtse blad, afkomstig van Beteka, zijn ze minder opvallend.
3. necrotische vlekjes; kunnen zowel op de stengels, bladstelen als bladeren optreden, echter vooral in de hogere gedeelten van de plant. Bij uitzondering kan het aanleiding geven tot insterving van de stengeltop; abusievelijk heeft men in de practijk hier wel gedacht aan topnecrose, veroorzaakt door het X-virus. Evenals de aucuba-achtige vlekjes, doen de necrotische vlekjes op de bladeren zich dikwijls in de vorm van figuurtjes voor. Ook lopen ze vaak in een soort boog over de blaadjes heen. Insnoeringen en misvormingen van het blad worden er sterk door in de hand gewerkt. Bij bepaalde aardappelrassen treden ook necrosen in de knol op, al dan niet gepaard gaande met misvormingen.
4. gedrongenheid van stengel; deze kan zeer sterk variëren en gaat vaak samen met meer of minder optreden van necrotische verschijnselen. De groeipunten kunnen volkomen in het gedrang komen.

Al naar het aardappelras en de uitwendige omstandigheden treden bovengenoemde verschijnselen al dan niet gecombineerd meer of minder duidelijk op. In het ene jaar kan b.v. het figuur-aucubabont zeer opvallend zijn, in het andere weinig of niet.

Bij het onderzoek bleek al spoedig, dat van deze ziekte bij eenzelfde aardappelras verschillende vormen optreden. Men zou hier kunnen denken aan modificaties; het feit, dat de minder en de meer virulente vormen jaren achtereen in de nateelten steeds als zodanig terugkeren, wijst veel meer op standvastige verschillen. Bij de virulentere vormen treden meer en heviger necrosen op dan bij de zwakkere. Er is dan ook alle reden om te spreken van „ziekten van het stengelbont-type".

Stengelbont kan met het pootgoed op de nateelt worden overgebracht, hetgeen wijst op het infectieuze karakter van de ziekte. Eerder is reeds gezegd, dat de ziektesymptomen het meest aan een virusziekte doen denken. Maar anderzijds wijkt deze ziekte sterk af van de andere virusziekten van de aardappelplant. Op drie punten van verschil dient gewezen te worden, te weten:

1. de bekende virusziekten (zoals b.v. bladrol en mozaiek) worden voor 100 % met het pootgoed op de nateelt overgebracht. Bij stengelbont loopt dit percentage sterk uiteen, nl. van 50 % en minder tot 100 %.
2. „normale" secundair viruszieke aardappelplanten zijn steeds geheel ziek. Bij stengelbont is het vaak slechts één stengel, die symptomen vertoont.
3. „gewone" viruszieke aardappelplanten genezen niet; een bladroller geeft nooit een gezonde nateelt. Stengelbontzieke planten kunnen echter wel een gezonde

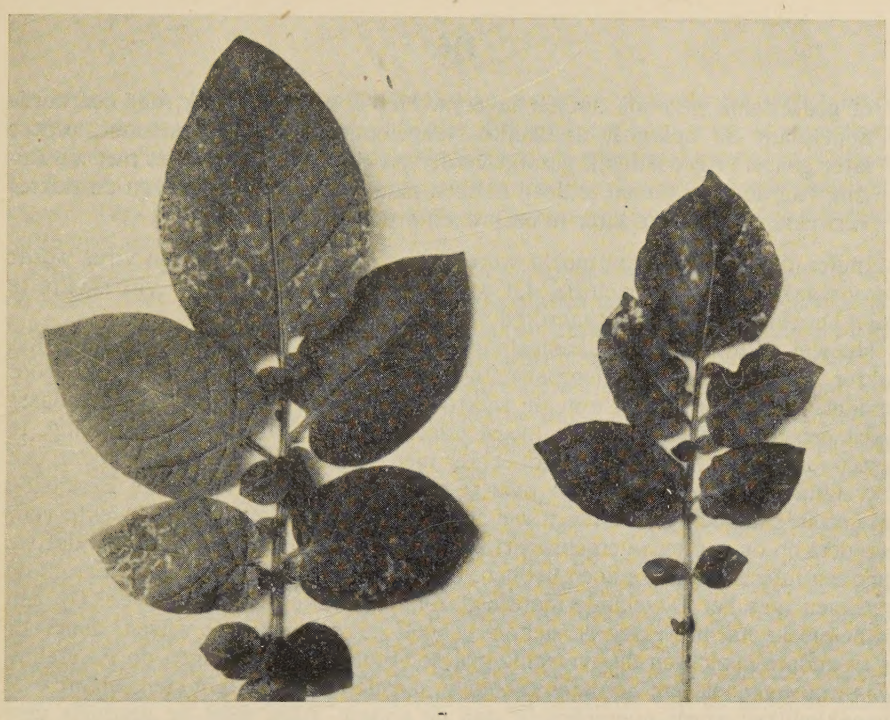

Fig. 1. Stengelbont symptomen (figuur aucuba). Links: Bevelander, rechts: Beteka.
Stem-mottle symptoms (figure aucuba mosaic). On the left: var. Bevelander, on the right: var. Beteka.
Photo's J. Boekhorst

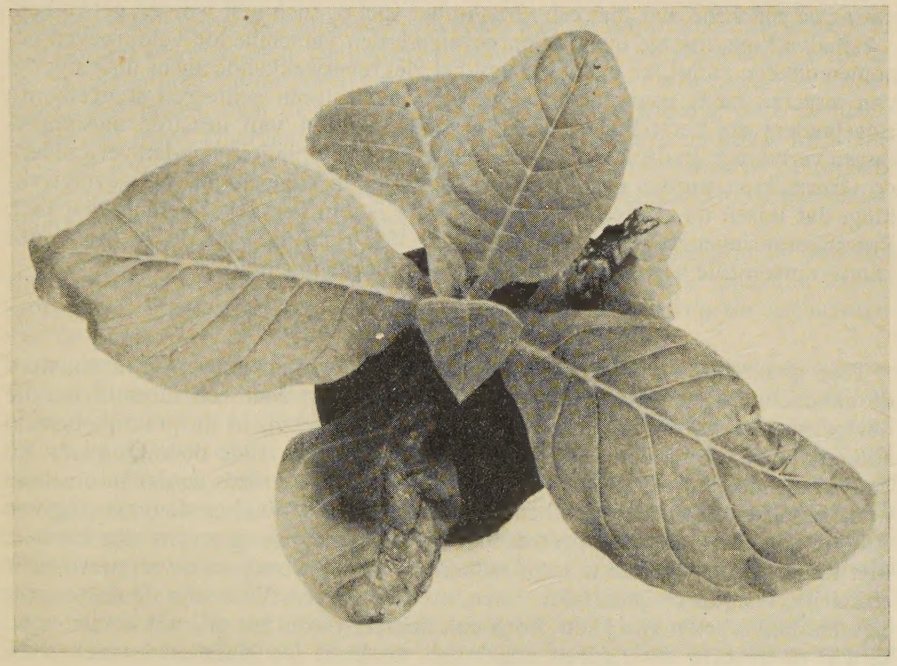

Fig. 2. Tabaksplant (Havanna IIC) op 30 Sept. 1947 geïnoculeerd met sap van stengelbontzieke Bevelander. De symptomen zijn locaal gebleven. Gefotografeerd op 23 October 1947.
Tobacco plant (var. Havanna IIC) inoculated on 30 September 1947 with sap from stem-mottle diseased Bevelander potato. Photographed on 23 October 1947. The symptoms have remained local.

of gedeeltelijk gezonde nateelt leveren. Het is zelfs mogelijk, dat een aardappelplant bij opkomst duidelijke stengelbontsymptomen vertoont, echter later geheel of gedeeltelijk gezond verder groeit. Dat we hier niet met maskering van de symptomen te doen hebben maar met afwezigheid van de ziekteverwekker zal uit een later te bespreken proef blijken.

Indien dan ook bewezen mocht worden, dat stengelbont door een virus wordt veroorzaakt, blijft de conclusie, dat we hier met een „ongewone" virusziekte te doen hebben, zeker gerechtvaardigd.

Hoewel de overgang van stengelbont met het pootgoed op een infectieus karakter wijst, zijn inoculatieproeven nodig ter definitieve bewijsvoering. Door middel van knolentingen kon de ziekte niet worden overgebracht; daarnaast werd gebruik gemaakt van de meest effectieve methode van overbrenging, te weten: stengelentingen. Het lukte echter niet op deze wijze het stengelbont van Bevelander op gezonde planten over te brengen. Entingen van zieke Eersteling op gezonde hadden daarentegen wel succes. Met de knollen werd de ziekte voor een deel op de nateelt overgebracht. Hiermede werd het bewijs geleverd, dat we met een infectieziekte te doen hebben. Onbeantwoord blijft de vraag waarom de entingen met het Bevelandermateriaal zonder resultaat zijn gebleven. Op een principieel verschil tussen de ziekten behoeft het zeker niet te wijzen; daarvoor is in andere opzichten de overeenkomst te groot. Bij de entingen op Eersteling was trouwens ook aan het licht gekomen, dat de ene vorm van stengelbont veel gemakkelijker wordt overgebracht dan de andere. Alles wijst op graduële verschillen en het is zeer waarschijnlijk, dat het werken onder gunstiger omstandigheden ook bij het Bevelandermateriaal succes zal boeken.

Hoewel we door bovengenoemde proeven een stapje nader waren gekomen mocht de conclusie, dat hier een virus in het spel is, toch niet worden getrokken.

Behalve kunstmatige inoculatieproeven werden verschillende veldproeven genomen om een mogelijke overgang van het ziekteverwekkende agens door middel van insecten na te gaan. Daartoe werden enkele jaren achtereen stengelbonte Bevelanders en Eerstelingen naast gezonde planten van dezelfde aardappelrassen verbouwd. In de nateelten van laatstgenoemde planten konden verschillende virusziekten worden geconstateerd, echter geen stengelbont. De gevolgtrekking, dat luizen de ziekten niet overbrengen, is dan ook zeker gerechtvaardigd. Practijkervaringen wijzen trouwens in dezelfde richting. Met dit al bleef onze kennis omtrent de oorzaak van deze ziekte in nevelen gehuld.

HET RATELVIRUS VAN DE TABAK

Toen gedurende de oorlogsjaren de tabaksteelt weer begon op te leven, werd de aandacht gevestigd op een ziekte, die zich uitte door een meer of minder hevige necrose op de bladeren en stengels. Deze ziekte, in de practijk bekend staande onder de namen „patrijs" of „ratel", werd in 1942 door QUANJER (3) nader bestudeerd. Het is waarschijnlijk dat deze ziekte reeds eerder in ons land in de tabaksteeltgebieden van het Land van Maas en Waal en de omgeving van Amerongen en Rhenen is opgetreden, doch nauwkeurige gegevens zijn hierover niet te verkrijgen. De ziekte is gekenmerkt door het voorkomen van necrotische cirkeltjes, boogjes en gekartelde lijnen, op de bladeren. Vaak zijn de necrotische figuren donkerbruin van kleur, doch ook lichtere tinten tot grijswit komen voor, terwijl de grootte der figuren nogal kan wisselen. De bladeren kunnen sterk

misvormd zijn, waarbij de randen vaak naar beneden zijn gekruld. Ook kunnen er gaten en gaatjes in het blad ontstaan. En tenslotte komen op de stengels en bladnerven vaak grijsbruine tot donkerbruine, doorgaans ingezonken vlekken en strepen voor. Het merg van de stengels is dikwijls plaatselijk donkergrijs verkleurd. Alles met elkaar genomen is deze ziekte zeer ernstig en er kan in bepaalde jaren veel schade door worden berokkend.

QUANJER (3) kon in 1942 aantonen, dat deze ziekte door een virus wordt veroorzaakt. Het gelukte hem nl. door sapinoculaties de typische ratelziekteverschijnselen op gezonde tabaksplanten te reproduceren, terwijl het hem niet gelukte uit de aangetaste plantendelen een organisme te isoleren, dat bij inoculatie de ziektesymptomen kon veroorzaken. Verder bewees hij, dat de besmetting van de tabaksplanten via de grond plaats heeft en dat dit reeds in het zaaibed geschiedt. Het was waarschijnlijk, dat deze ziekte overeenkomt met een tabaksziekte, die door BÖNING (1) in Duitsland werd bestudeerd. SMITH (5) classificeerde het virus, dat deze ziekte veroorzaakt, als Nicotiana-virus 5.

Nadere onderzoekingen, die door de tweede schrijver met betrekking tot deze ziekte sedert 1946 zijn verricht, hebben o.a. nog de volgende resultaten opgeleverd. Gedurende Juni, Juli en begin Augustus van 1946 werd getracht de ratelziekte door sapinoculatie op gezonde planten over te brengen, doch deze pogingen bleven alle vruchteloos. Hierbij werd vers perssap van in de practijk verzamelde ratelzieke tabaksplanten op bladeren van een jonge, gezonde tabaksplant met een propje watten uitgestreken. De bladeren van de gezonde plant waren vooraf met fijn carborundumpoeder bestrooid. Eind Augustus en in het najaar slaagden evenwel dezelfde experimenten op verrassende wijze. Na circa 5 dagen verschenen op de geïnoculeerde bladeren bruine ringvormige necrosen en reeds 10 tot 14 dagen na de inoculatie werden spreidsymptomen waargenomen. Deze spreidsymptomen komen sterk overeen met de symptomen, die in de practijk worden waargenomen. De bladeren beginnen bruine tot beigekleurige streepjes en ringvormige figuurtjes te vertonen, terwijl zij bij het uitgroeien misvormingen te zien geven, daar de nog groene gedeelten wel uitgroeien, doch de necrotische niet meer. Doorgaans blijft de plant sterk gedrongen en groeit hij weinig of in het geheel niet uit. Ook op de stengels en bladnerven treden de necrotische ingezonken vlekken op, welke wij ook uit de practijk kennen. Op de aangetaste plaatsen breken bladeren en stengels zeer gemakkelijk af.

Uit het feit, dat de inoculaties gedurende de middenzomer in de kas niet slaagden doch wel gedurende de nazomer en de herfst, blijkt duidelijk dat de uitwendige omstandigheden een sterke invloed uitoefenen op de vatbaarheid van de plant.

Reeds in 1946 werd waargenomen dat zeer zieke planten, verzameld op tabaksvelden in het Land van Maas en Waal, overgebracht naar en opgepot in de kas, na verloop van tijd bladeren vormden die vrij waren van ratelsymptomen. Werden deze bladeren onder gunstige uitwendige omstandigheden geïnoculeerd met sap van volkomen zieke planten, dan bleken zich hierop na ongeveer 5 dagen de typische ringvormige necrotische vlekken te ontwikkelen. Sap gewonnen van deze symptoomloze bladeren, gevormd aan een plant, die eerst zeer ziek was geweest, bevatte geen virus. Gezonde tabaksplanten, die met sap van deze bladeren geïnoculeerd werden, bleven nl. vrij van enig virussymptoom.

In 1947 werd ook wel eens geconstateerd, dat een plant, na een periode van sterke ziekteverschijnselen, bladeren of (na afsnijden van de top) scheuten ging

vormen, die slechts zeer geringe symptomen vertoonden. Er was dan b.v. slechts een enkel necrotisch vlekje of fijn necrotisch lijntje zichtbaar. Reeds QUANJER (3) onderscheidde hevige en mildere symptomen van deze ziekte. Werd een dergelijk blad, met milde symptomen, geïnoculeerd met sap van een plant met hevige symptomen, dan ontwikkelden zich geen locale necrotische ringen en vlekken. Hieruit blijkt, dat deze nieuw gevormde bladeren met slechts geringe symptomen premuun zijn tegen een nieuwe inoculatie. Uit inoculatieproeven op gezonde tabaksplanten bleek het virus in die bladeren echter wel van normale virulentie te zijn, daar na de incubatietijd van ongeveer 5 dagen, hevige necrotische vlekken en ringen op de bladeren van de gezonde plant ontstonden. Ook in de pratijk kan men soms een genezing waarnemen, waarbij een in het begin sterk aangetaste plant gezonde bladeren gaat vormen. Uit al deze proeven blijkt nogmaals duidelijk het viruskarakter van de ratelziekte. Dat het ratelvirus waarschijnlijk niet door insecten wordt overgebracht moge volgen uit een in 1946 genomen veldproef, waarbij tussen rijen gezonde tabak, opgekweekt in gestoomde grond, op natuurlijke wijze besmette tabaksplanten waren ingeplant. Hoewel op alle tabaksplanten bladluizen werden waargenomen, bleven de gezonde tabaksplanten tot het laatste toe gezond.

Als laatste belangrijke ervaring aangaande de ratelziekte valt op te merken, dat in enkele perceeltjes, waar tabaksplanten waren uitgeplant, die gezaaid en verspeend waren in gestoomde grond, een bepaald percentage dezer planten (in 1946 gemiddeld 10 %) ratelziekteverschijnselen ging vertonen. Het ging hierbij om percelen, waar niet eerder tabak op was verbouwd. De conclusie hiervan is:

1. dat in gestoomde grond opgekweekte tabaksplanten na uitplanten op het veld via de grond besmet kunnen worden met het ratelvirus ;
2. dat het voorkomen van een tweede waardplant of wellicht meer waardplanten waarschijnlijk is.

Bij een bezoek in 1946 aan het Lab. voor Mycologie en Aardappelonderzoek herkende Dr H. P. HANSEN uit Holte (Denemarken) de ratelziekte als een tabaksziekte, die in Denemarken voorkomt onder de naam van Streg-Krøllesyge. Later ontvingen wij naar aanleiding hiervan zijn publicatie (2).

VERGELIJKING TUSSEN STENGELBONT EN RATELZIEKTE

Bij vergelijking van bovengenoemde ervaringen bij de stengelbontziekte van de aardappel en de ratelziekte van de tabak blijkt dat de overeenkomst tussen de ziekten in heel veel opzichten zeer groot is. Intuïtief drong de gedachte aan verwantschap zich sterk op en het lag dan ook volkomen voor de hand om sap van een zieke aardappelplant over te brengen op tabak. In de jaren 1942 en 1943 was dit door de eerste schrijver reeds gedaan, en wel in de maand Juli. Echter zonder enig resultaat. Uit proeven met verschillende aardappelviren op tabak en aardappel was hem later gebleken, dat de ziekteverschijnselen op de geïnoculeerde bladeren gedurende de herfstmaanden veel duidelijker te voorschijn komen dan in de zomermaanden. In de zomermaanden krijgt men vaak niets te zien. Belichting en temperatuur schijnen hierop een grote invloed uit te oefenen. Gezien ook de ervaringen met het ratelvirus lag het voor de hand om sap van een stengelbontzieke aardappelplant in de herfst over te brengen op tabak. Dit

gebeurde op 2 October 1946; uitgegaan werd van stengelbonte Bevelander. Na ongeveer acht dagen verschenen op de geïnoculeerde bladhelften duidelijke locale necrotische vlekjes en figuurtjes. De verschijnselen kwamen volkomen overeen met die welke verschillende viren op bepaalde planten kunnen geven. Dat het aardappelras Bevelander geen verborgen virus bevat werd bewezen door inoculaties met sap van gezonde Bevelander op tabak. Hierbij trad geen enkel verschijnsel op, zodat geconcludeerd moet worden, dat de oorzaak van de locale verschijnselen bij tabak ook de oorzaak van de stengelbontsymptomen bij aardappel is. Uit deze proeven bleek niet alleen dat het stengelbont door een virus wordt veroorzaakt, er viel nog meer uit af te leiden. De locale necrotische verschijnselen deden nl. zeer veel denken aan die van het ratelvirus op tabak. Het enige wezenlijke verschil bestond eigenlijk hierin, dat het stengelbontvirus locaal bleef, terwijl het ratelvirus na verloop van tijd ook spreidsymptomen teweegbracht. Desalniettemin werd in de reeds eerder genoemde publicatie (4) de mogelijkheid van een verwantschap tussen de ziekten naar voren gebracht.

Om de eventuele identiteit nader te bewijzen, werd door de schrijvers het plan opgevat de proeven in het groot te herhalen en naar elkaar toe te gaan werken. Gelijktijdig zou door de een het stengelbontvirus op tabak en aardappel worden overgebracht en door de ander het ratelvirus op dezelfde planten.

Wat stengelbont betreft werd uitgegaan van verschillende herkomsten, te weten:

1. stengelbonte Bevelander;
2. stengelbonte Bevelander, tevens besmet met X-virus;
3. Bevelander, genezen van stengelbont;
4. stengelbonte Beteka;
5. stengelbonte Magneto, tevens besmet met X-virus en
6. stengelbonte Eersteling, tevens besmet met topnecrose-X-virus.

Het in de proeven gebruikte ratelvirus was in de voorzomer van 1947 verzameld in een tabaksaanplant te Wageningen. De tabaksplanten, welke geïnoculeerd werden, behoorden tot het vatbare ras Havanna II C. Begin October vonden de sapinoculaties plaats; ter verhoging van de infectiekansen werden de te bewerken bladhelften van te voren met fijn carborundumpoeder bestrooid. Iedere serie bestond uit minstens acht planten. Ter contrôle werden eenzelfde aantal planten met sap van gezonde Bevelander behandeld; deze planten hebben geen enkel symptoom te zien gegeven. De verschillende series leverden de volgende resultaten op:

1. Het virus van stengelbonte Bevelander gaf na 4 dagen duidelijke locale verschijnselen op tabak. Niet alleen was de incubatietijd dezelfde als bij het ratelvirus, maar ook de symptomen waren van dezelfde hevigheid, het laatste in tegenstelling tot het vorige jaar. Hoewel toen de ziekteverschijnselen in principe zeker identiek waren, was het aantal vlekjes en de intensiteit van de necrose veroorzaakt door het stengelbontvirus veel geringer dan die teweeggebracht door het ratelvirus. Onwillekeurig werd dan ook verwacht, dat dit jaar de locale verschijnselen door spreidsymptomen zouden worden gevolgd. Het kwam wel tot een vervloeiing van de necrotische vlekken en figuren, zelfs tot een hevige hoofdnerfnecrose (zie fig. 2) en uiteindelijk dikwijls tot een volledige verdroging van de geïnoculeerde bladhelften, echter niet tot spreid-

symptomen. Tot identiteit van beide ziekten kon dan ook wederom niet worden besloten.

2. Stengelbonte Bevelander, tevens besmet met X-virus, gaf op de geïnoculeerde tabaksbladeren dezelfde verschijnselen te zien als hierboven. De nieuw gevormde bladeren vertoonden na verloop van tijd typische X-virus verschijnselen; het stengelbontvirus bleef echter gelocaliseerd. Het X-virus was dus niet in staat het laatstgenoemde virus „mee te slepen".
3. Sap van genezen Bevelanders gaf niet de minste locale of andere verschijnselen op tabak. Hiermede werd bewezen, dat deze planten werkelijk vrij van virus zijn.
4. Stengelbonte Beteka gaf na 4 dagen dezelfde locale verschijnselen op tabak als stengelbonte Bevelander. Ongeveer 6 dagen later verschenen hier wel spreidsymptomen; dit tijdstip viel geheel samen met het optreden van spreidsymptomen bij de met ratelvirus geïnoculeerde tabaksplanten. Bij het verdere verloop bleek, dat de symptomen in niets van elkaar afweken. Beter dan een omschrijving geven hier foto's een beeld van de identiteit van de beide ziekten. De figuren 3 en 4 laten een bovenaanzicht zien van tabaksplanten, die door het stengelbontvirus respectievelijk het ratelvirus zijn aangetast. Ratelzieke tabaksplanten zijn niet alleen gekenmerkt door necrotische vlekjes en figuurtjes op de bladschijf, maar ook door necrosen op de nerven welke in het bijzonder aan de onderzijde van het blad zichtbaar zijn. Ook hier treden de necrosen vaak in de vorm van figuren op. Van de bladsteel gaat de necrose soms over op de stengel. Bij vergelijking van de figuren 5 en 7, resp. vertonend een onderaanzicht van een tabaksplant besmet met het stengelbontvirus en het ratelvirus, is het duidelijk, dat ook in dit opzicht de overeenkomst volkomen is.
5. Stengelbonte Magneto (tevens besmet met X-virus) gaf op tabak reeds na 3 dagen locale symptomen; na een week verschenen de eerste spreidsymptomen. Het blad volgend op de geïnoculeerde bladeren werd typisch ratelziek (zie fig. 6), de daarna gevormde bladeren vertoonden naast een bontheid en wat necrotische vlekjes een hevige gele verkleuring van de nerven („veinclearing") en fijne gele figuurtjes. Bij vergelijking met figuur 3 valt het verschil duidelijk op. De gelijktijdige aanwezigheid van het X-virus is hier blijkbaar oorzaak van het ontstaan van een ander ziektebeeld. Het is gerechtvaardigd hier te spreken van een complex-ziekte. Het X-virus alleen geeft slechts een zwak en een ander ziektebeeld op tabak. De combinatie van beide viren blijkt veel ingrijpender te zijn.
6. Stengelbonte Eersteling wist het slechts tot locale ratelsymptomen te brengen. Het topnecrose-X-virus, waarvoor dit ras smetstofdrager is, drong wel in de rest van de plant door, maar veroorzaakte slechts zwakke, voor X-virus typische ziekteverschijnselen.

Reeds uit deze proeven kon tot een verwantschap, respectievelijk identiteit, van het stengelbont- en de ratelziekte worden besloten. Gelijktijdig werd het bestaan van verschillende stammen van dit virus gedemonstreerd. Achteraf is het gerechtvaardigd de in de oorlog verloren geraakte drie verschillende vormen van stengelbont bij het aardappelras Eersteling toe te schrijven aan drie verschillende virusstammen.

Fig. 3. Tabaksplant (Havanna IIC) op 2 October 1947, geïnoculeerd met sap van stengelbontzieke Beteka. Locale- en spreidsymptomen. Gefotografeerd op 16 October 1947.
Tobacco plant (var. Havanna IIC) inoculated on 2 October 1947 with sap from stem-mottle diseased Beteka potato. Local and systemic symptoms. Photographed on 16 October 1947.

Fig. 4. Tabaksplant (Havanna IIC) op 2 October 1947 geïnoculeerd met sap van ratelzieke tabak. Locale- en spreidsymptomen. Gefotografeerd op 16 October 1947.
Tobacco plant (Havanna IIC) inoculated on 2 October 1947 with sap from rattle diseased tobacco. Local and systemic symptoms. Photographed on 16 October 1947.

Fig. 5. Tabaksplant (Havanna IIC) op 2 October 1947, geïnoculeerd met sap van stengelbontzieke Beteka. Locale- en spreidsymptomen. Gefotografeerd op 16 October 1947. *Tobacco plant (var. Havanna IIC) inoculated on 2 October 1947 with sap from stem-mottle diseased Beteka potato. Local and systemic symptoms. Photographed on 16 October 1947.*

Fig. 6. Tabaksplant (Havanna IIC) op 2 October 1947 geïnoculeerd met sap van stengelbontzieke Magneto, tevens besmet met X-virus. Een complex ziektebeeld. Gefotografeerd op 4 November 1947. *Tobacco plant (var. Havanna IIC) inoculated on 2 October 1947 with sap from stem-mottle diseased Magneto potato, infected also with virus X. Complex symptoms. Photographed on 4 November 1947.*

Fig. 7. Tabaksplant (Havanna IIC) op 2 October 1947 geïnoculeerd met sap van ratelzieke tabak. Locale- en spreidsymptomen. Gefotografeerd op 16 October 1947. *Tobacco plant (Havanna IIC) inoculated on 2 October 1947 with sap from rattle diseased tobacco. Local and systemic symptoms. Photographed on 16 October 1947.*

Fig. 8. Aardappelbladeren (Eersteling) op 2 October 1947 geïnoculeerd met sap van ratelzieke tabak. Links: bovenzijde. Rechts: onderzijde. Gefotografeerd op 17 October 1947. *Potato leaves (var. Duke of York) inoculated on 2 October 1947 with sap from rattle diseased tobacco. On the left: upperside. On the right: underside. Photographed on 17 October 1947.*

De volgende proeven met aardappelplanten gaven een bevestiging van deze conclusies. Als stengelbont-inoculatie-materiaal werd gebruikt vers perssap, respectievelijk afkomstig van:

1. stengelbonte Bevelander;
2. stengelbonte Beteka;
3. stengelbonte Magneto, tevens besmet met X-virus en
4. stengelbonte Eersteling, tevens besmet met topnecrose-X-virus.

Ter vergelijking diende sap van tabaksplanten, besmet met dezelfde herkomst van het ratelvirus als die, welke in de vorige proeven was gebruikt.

Met deze virus-herkomsten werden eind September en begin October planten van de rassen Eersteling, Bevelander en Beteka geïnoculeerd; ook hier waren de bladhelften van te voren met fijn carborundumpoeder bestrooid. Iedere serie bestond uit vijf planten. De keuze was op genoemde aardappelrassen gevallen, omdat zij bij uitstek vatbaar zijn voor het stengelbontvirus.

Het resultaat van deze proef was, dat na ongeveer een week op de geïnoculeerde bladeren in alle series van met stengelbont geïnoculeerde planten duidelijk ringvormige necrotische vlekken begonnen op te treden. Soms waren ook necrotische gekartelde lijntjes zichtbaar, welke vaak de nerven volgden. Ongeveer een week daarna begonnen vooral de oudere geïnoculeerde bladeren naar geel te verkleuren, terwijl ook de nerven necrotisch werden. De necrotische vlekken vloeiden toen van lieverlede in elkaar over en spoedig hierna gingen de geïnoculeerde bladeren verwelken. Bij Eersteling werden ook necrotische strepen in de bladstelen waargenomen. Dit ras reageerde over het algemeen iets heviger dan Bevelander en Beteka.

Identieke verschijnselen werden verkregen op de bladeren van de aardappelplanten, die geïnoculeerd waren met het ratelvirus. Een duidelijk beeld van de beschreven symptomen geven de figuren 8, 9, 10, 11 en 12.

Merkwaardg is dat die symptomen zich in alle gevallen tot de geïnoculeerde bladeren bepaalden, m.a.w. locaal bleven. Daarentegen traden wel spreidsymptomen op in het ras Beteka, dat met het sap van Eersteling en Magneto was bewerkt. Doch deze verschijnselen, die zich uitten in een bontheid in de top en het ontstaan van necrotische stippen, moeten worden toegeschreven aan de X-viren, welke, zoals reeds werd medegedeeld, in deze gevallen naast het stengelbontvirus aanwezig waren.

Aangezien het evenwel denkbaar bleef, dat het stengelbont-, respectievelijk ratelvirus zich door de planten had verspreid, zonder verdere symptomen te veroorzaken, werden in 1948 de door deze planten gevormde knollen nageteeld. Echter vertoonde geen der planten die uit deze knollen opgroeien stengelbontverschijnselen, zodat mag worden aangenomen, dat het virus inderdaad in de geïnoculeerde bladeren gelocaliseerd is gebleven. Alleen in enkele bladeren van het ras Eersteling werd zoals gezegd, necrose in de bladsteel waargenomen, hetgeen er op wijst, dat hier wel enig transport van het virus heeft plaats gehad.

Waarop deze localisatie van het stengelbont- en ratelvirus berust is hiermede niet duidelijk geworden. In dit verband mag gewezen worden op de genoemde publicatie van Hansen (2), die vermeldt, dat een aardappelplant van het ras King Edward, welke geënt was met een ratelzieke tabaksstengel op de jonge bladeren van verscheidene stengels enkele donkerbruine necrotische vlekken ging vertonen. Sap van deze bladeren gaf op tabak na 6 dagen typische ratelsymp-

Fig. 9. Aardappelbladeren (Bevelander) op 30 September 1947 geïnoculeerd met sap van stengelbontzieke Bevelander. Gefotografeerd op 17 October 1947.
Potato leaves (var. Bevelander) inoculated on 30 September 1947 with sap from stem-mottle diseased Bevelander potato. Photographed on 17 October 1947.

Fig. 10. Aardappelbladeren (Bevelander) op 2 October 1947 geïnoculeerd met sap van ratelzieke tabak. Gefotografeerd op 17 October 1947.
Potato leaves (var. Bevelander) inoculated on 2 October 1947 with sap from rattle diseased tobacco. Photographed on 17 October 1947.

Fig. 11. Links: onderzijde van aardappelblad (Eersteling) op 30 September 1947 geïnoculeerd met sap van stengelbontzieke Bevelander. Rechts: onderzijde van aardappelblad (Eersteling) op 2 October 1947 geïnoculeerd met sap van ratelzieke tabak. Gefotografeerd op 10 October 1947.
On the left: underside of potato leaf (var. Duke of York) inoculated on 30 September 1947 with sap from stem-mottle diseased Bevelander. On the right: underside of potato leaf (var. Duke of York) inoculated on 2 October 1947 with sap from rattle diseased tobacco. Photographed on 10 October 1947.

Fig. 12. Aardappelbladeren (Eersteling) op 30 September 1947 geïnoculeerd met sap van stengelbontzieke Bevelander. Links: bovenzijde. Rechts: onderzijde. Gefotografeerd op 17 October 1947. *Potato leaves (var. Duke of York) inoculated on 30 September 1947 with sap from stem-mottle diseased Bevelander. On the left: upperside. On the right: underside. Photographed on 17 October 1947.*

tomen. In het begin is reeds vermeld, dat bij stengelenting van zieke Eersteling op gezonde het virus in de gehele onderstam kan doordringen; entproeven van ratelzieke tabak op gezonde aardappelplanten zijn echter nog niet genomen. Het hangt blijkbaar af van de wijze, waarop het virus in de aardappelplant wordt gebracht, of het virus zich daarin zal verspreiden.

Böning (1) vermeldde indertijd, dat de tabaksziekte, die waarschijnlijk identiek is met onze ratelziekte, niet op aardappel is over te brengen. Het is niet onmogelijk, dat hij gewerkt heeft met een aardappelras dat weinig of niet vatbaar is voor dit virus. Ook kan het jaargetijde waarin de inoculaties werden verricht hem parten hebben gespeeld. In dit verband is het vermeldenswaard mede te delen, dat de in Juli uitgevoerde sapinoculaties van de genoemde stengelbontviren en het ratelvirus op de aardappelrassen Bevelander en Eersteling ook veel minder succes hebben gehad dan die in October.

Hoewel uit deze proeven reeds duidelijk is geworden dat de ratelziekte in de groep der stengelbontviren thuishoort, is het belangrijk nog de volgende waarnemingen te memoreren.

In 1946 bevond zich onder Bennekom een tabaksaanplant, die voor verreweg het grootste gedeelte hevig door ratelvirus was aangetast. Er werd besloten in 1947 op dit terrein een groot aantal aardappelrassen, die in de practijk sterk vatbaar voor stengelbont waren gebleken, te poten, afgewisseld met tabak. Gedurende de gehele zomer van 1947 bleven de aardappels evenals de tabaksplanten tot het einde van de groei volkomen vrij van stengelbont- respectievelijk ratelverschijnselen. Bij het rooien der aardappels bleek hierin wel kringerigheid voor te komen. Een deel van de knollen dezer planten werd dit jaar nageteeld op het terrein van het laboratorium waar het stengelbontvirus niet voorkomt. In de loop van deze zomer werd merkwaardigerwijs het volgende geconstateerd. Hoewel de moederplanten in het geheel geen loofsymptomen hadden vertoond waren in de nateelt een aantal planten duidelijk stengelbontziek. Het resultaat van deze proef is samengevat in tabel 1 (zie blz. 128).

De grote vatbaarheid van Bevelander voor stengelbont komt hier weer duidelijk naar voren. Merkwaardigerwijze heeft het minstens even vatbare ras Eersteling en zijn knopmutant Rode Eersteling geen enkele stengelbontzieke plant in de nateelt gegeven. Het ging hier om 56 respectievelijk 64 planten. Ook de 64 planten van het vatbare ras Frühmölle waren alle gezond. Het is niet onmogelijk dat de verklaring van dit verschijnsel moet worden gezocht in de vroegheid van deze rassen. Uit het feit, dat het vorig jaar in geen enkel ras stengelbontsymptomen te zien zijn geweest kan worden afgeleid, dat de infecties waarschijnlijk pas laat in het groeiseizoen hebben plaatsgevonden. De planten waren toen blijkbaar te oud om met ziekteverschijnselen te reageren. De waarneming, dat alle planten, met uitzondering van twee bij het ras Bevelander, slechts gedeeltelijk ziek waren (meest ging het om 1 zieke stengel) wijst eveneens op een late infectie. Wellicht waren toen de drie bovengenoemde vroege rassen al in een dermate vergevorderd stadium, dat infectie niet meer kon plaats vinden. Hoewel de tabaksplanten op dit proefveldje het vorig jaar geen ratelsymptomen hebben vertoond, kan uit het bovenstaande toch worden afgeleid dat op grond, welke besmet is met het ratelvirus, de aardappels geïnfecteerd kunnen worden. Dat de omstandigheden hierop een grote invloed uitoefenen bleek uit het volgende. Om bepaalde redenen kon het proefveldje niet geheel gespit en bemest worden. Het merk-

TABEL 1.

Stengelbont in de nateelt van aardappelen die het vorig jaar op met ratelvirus besmette grond waren gegroeid

Stem-mottle in the progeny of potatoes, grown last year on soil infested with rattle virus

Ras *Variety*	Aantal planten *Number of plants*			
	geplant *planted*	gezond *healthy*	ziek *diseased*	percentage ziek *percentage diseased*
Bevelander	124	78	46 [1])	37
Beteka	64	50	14	22
Eigenheimer	32	29	3	9
Magneto	64	58	6	9
Ysselster	60	56	4	7
Geelblom	60	58	2	3
Eersteling (Duke of York)	56	56	0	0
Rode Eersteling (Red Duke of York)	64	64	0	0
Frühmölle	64	64	0	0

[1]) Twee van deze planten waren geheel ziek
Two of these plants were fully diseased

waardige was nu, dat de tabaksopslag op het onbewerkte gedeelte voor een flink percentage wel ratelziek werd. Het is dan ook niet onmogelijk dat ziekten van dit type door bepaalde cultuurmethoden bestreden kunnen worden.

Hoewel door QUANJER (3) reeds was aangetoond, dat besmette grond overgebracht in zaaipannen de tabak reeds vroegtijdig doet ziek worden, was het alleszins wenselijk dergelijke proeven ook ten aanzien van de aardappel te nemen. Daartoe werd in het voorjaar van 1948 grond overgebracht naar het laboratorium van een akker te Sappemeer [2]), waarop de laatste jaren stengelbont in aardappelen zeer hevig was opgetreden. Deze grond was afkomstig van 3 verschillende plekken (A, B en C), terwijl van elke plek grond beschikbaar was van de oppervlakkige laag (0–22 cm diepte) en van de daaronder liggende laag (22–45 cm diepte). Tevens was grond van de Proeftuin voor Tabak te Wageningen (aangeduid met D), waar de tabak in 1947 ratelziek was, beschikbaar. In een gedeelte van deze gronden werden aardappelen van het ras Eersteling gepoot, in een ander deel tabak (Havanna IIc) gezaaid. Wat de aardappel betreft vertoonde geen enkele serie onmiskenbare stengelbontsymptomen. Gezien de reeds eerder vermelde ervaring moet het niet onmogelijk worden geacht, dat in de nateelt van deze planten alsnog stengelbont te zien zal zijn. Merkwaardig is ook, dat de dit jaar te Sappemeer verbouwde Erstelingen eveneens zonder symptomen zijn gebleven.

De tabaksplantjes groeiden niet zeer voorspoedig, daar de grond spoedig na het zaaien dichtsloeg; ook trad in de meeste zaaisels smeul op, ten gevolge waarvan vele plantjes te loor gingen. Pas in Juni werden de planten op een terrein uitgeplant waar niet eerder tabak of aardappel hadden gestaan. Tabel 2 geeft de aantallen ratelzieke tabaksplanten weer, die later werden geteld.

[2]) De heer Ir J. Brust wordt hierbij hartelijk dank gezegd voor de vele moeite welke hij zich heeft getroost om ons aan de waardevolle grondmonsters te helpen.

TABEL 2.

Ratelziekte bij tabak, gezaaid in grond, afkomstig van met stengelbont- (A, B en C) of ratelvirus (D) besmette terreinen

Rattle disease on tobacco, sown in soil samples collected from fields infested with stem-mottle (A, B and C) or rattle virus (D)

Grondmonster *Soil sample*	Aantal planten *Number of plants*			
	geplant *planted*	gezond *healthy*	ziek *diseased*	percentage ziek *percentage diseased*
A 0–22 cm	107	70	37	35
A 22–45 cm	27	25	2	7
B 0–22 cm	59	28	31	53
B 22–45 cm	7	0	7	100
C 0–22 cm	69	64	5	7
C 22–45 cm	38	0	0	0
D	188	186	2	1

Hieruit blijkt, dat tabak, gezaaid in grond waarop in voorgaande jaren stengelbont in de aardappel voorkwam, voor een meer of minder hoog percentage ratelziek wordt. Uit deze tabel blijkt tevens, dat de smetstof niet alleen in de oppervlakkige laag van de bouwvoor voorkomt, doch ook dieper.

Ten slotte moge hier gewezen worden op het feit, dat zowel het stengelbontvirus van verschillende herkomst, als het ratelvirus, op gelijke wijze is te zuiveren en dat deze viren hierna gedurende enige maanden bij 0 °C bewaard kunnen blijven, zonder hun activiteit te verliezen. Dit, evenals het electronenmicroscopisch onderzoek van deze viren, is nader beschreven in een aparte publicatie (6).

SAMENVATTING

Inoculatieproeven brachten niet alleen de identiteit van het ratel- en stengelbontvirus aan het licht, maar tevens het bestaan van onderscheidene stammen van dit virus.

Veld- en potproeven bevestigden de identiteit. Verder bleek hierbij dat aardappelen, verbouwd op besmette grond, welke gedurende het groeiseizoen geen enkele afwijking te zien gaven, in de nateelt een meer of minder hoog percentage stengelbontzieke planten kunnen opleveren.

Bovendien bleek, dat het virus niet alleen in de oppervlakkige laag van de bouwvoor voorkomt, doch ook dieper.

SUMMARY

Since 1937 a potato disease known as „stem-mottle" has been studied by the first author. It has the peculiar characteristic that in many cases it is only one stem which shows the symptoms and it was for this reason that the disease was originally called stem-mottle by the inspectors. In two respects the name is misleading, since it is not a mottle of the stem but of the leaves, and since completely diseased plants also occur. The disease occurs only on certain types of soils; it has so far been found only on light or peat soils and is often limited to special parts of fields. The disease has not yet been described from other countries, but it seems unlikely that it is confined to the Netherlands. The occurrence

of the disease near our eastern and southern borders is of significance in this connection.

Four main disease symptoms can be distinguished on plants affected with stem-mottle.

1. a mottling of the leaves, 2. figure-aucuba mosaic (see fig. 1), 3. necrotic spots on leaves, petioles, stem and in the tubers of some potato varieties and 4. more or less dwarfing. A more detailed description of the disease was published in 1947 (4). Because there are variants differing in virulence, the disease is referred to as „of the stem-mottle type".

Stem-mottle can be transmitted through the tuber to the progeny, which is an indication of the infectious nature of the disease. The symptoms resemble those of a virus disease, but on the other hand there are marked differences from the typical potato virus diseases, viz.

1. In contrast to leaf-roll, for example, stem-mottle is not always transmitted through the tuber; the percentage of transmissions fluctuates from 50 % or less to 100 %.
2. Stem-mottle plants are often only partially diseased.
3. Potato plants affected with the typical virus diseases do not recover. Stem-mottle diseased plants, on the other hand, often give rise to healthy or partially healthy offspring.

To prove the infectious nature of the disease inoculation experiments were carried out. It was found to be impossible to transmit the disease by tuber-grafts. Stem-grafts with scions of diseased Bevelander on to healthy Bevelander were also unsuccessful, but stem-grafts with diseased Duke of York on healthy Duke of York were partially successful, especially the grafts with the more virulent variant of the disease. Some of the tubers of these grafted plants transmitted the disease to the progeny. The infectious nature of the disease was thus proved, but it was not yet certain whether or not the causal factor was a virus.

It was shown bij field experiments that aphids do not transmit the disease.

During the war years, when tobacco cultivation became of more importance in the Netherlands, a necrotic disease of tobacco, called „rattle" disease, was recognized. QUANJER (3), studying this disease, found that it was caused by a virus and that this virus is carried in some soils. Tobacco sown in contaminated soil develops the disease after transplanting to the field, or sometimes even in the seedbeds. Steaming the infested soil destroys the virus. Aphids are not able to transmit the virus. Probably the rattle disease is similar to a tobacco disease described by BÖNING (1) in Germany and classified by SMITH (5) as Nicotiana-virus 5. Dr H. P. HANSEN from Holte (Denmark), visiting the Laboratory for Mycology and Potato Research and seeing a rattle diseased tobacco plant, said that the rattle disease occurs also in Denmark and that it is there called Streg-Krøllesyge (2).

In 1946 the second author, studying the rattle disease, found that healthy tobacco plants, sown and transplanted in steamed soil and then transferred to soils in which tobacco had never been grown, might become naturally infected with the rattle disease during the growing season. It was concluded from these field experiments that there exists some other host plant of the rattle virus, or possibly more than one. It was found also, that inoculation experiments with the rattle virus carried out during the summer months, when temperatures were

on the high side, remained unsuccessful. The same experiments carried out in the autumn gave good results: after about 5 days local lesions developed and after 10 to 14 days systemic symptoms appeared.

Comparing what was known of the stem-mottle disease of potato and the rattle disease of tobacco, it was obvious that there were many similarities. It was therefore considered of interest to carry out inoculations with the juice of diseased potatoes on healthy tobacco. This had already been done during the month of July as long ago as 1942 and 1943, but without success. Experience showed that the symptoms caused by various potato viruses on inoculated leaves of tobacco and potato are much more distinct in the autumn than in the summer months. This was also the case, as already mentioned, with the rattle virus of tobacco. The experiments using stem-mottle virus on tobacco were therefore repeated in 1946, but on this occasion during the autumn. Already after 8 days the first symptoms appeared on the inoculated halves of the leaves as greyishbrown spots, often in the form of arcs and rings. Systemic symptoms did not follow.

We are obviously dealing here with typically local reactions, which are characteristic for some viruses. Sap from healthy Bevelander potatoes, used as a control, did not give any lesions. The conclusion that a virus is the cause of stem-mottle seems justified by the characteristic symptoms and by the analogy shown with other virus diseases. But there was more of interest: the local necrotic lesions produced were very similar to those of the rattle virus of tobacco. The principal difference was that those of stem-mottle virus remained local, whereas those of the rattle virus were followed after some days by systemic infection. Nevertheless, it was considered as early as the beginning of 1947 (4) that there might be a relationship between the two diseases.

In the autumn of 1947 collaborative experiments were started by the authors on a larger scale. While one author was responsible for experiments on transmitting the stem-mottle virus to tobacco and potato, the other carried out similar experiments with the rattle virus.

For the experiments with stem-mottle virus the following sources were used:

1. stem-mottle diseased Bevelander potato;
2. stem-mottle diseased Bevelander, infected also with virus X;
3. Bevelander potato recovered from stem-mottle;
4. stem-mottle diseased Beteka potato;
5. stem-mottle diseased Magneto potato, infected also with virus X;
6. stem-mottle diseased Duke of York potato, infected also with virus X.

The *Nicotiana tabacum* plants used were of the Dutch variety Havanna II C. The results of the experiments may be summarized as follows:

1. The stem-mottle virus from Bevelander potato produced local lesions on tobacco after 4 days. The incubation period and the symptoms were the same as those of the rattle virus. As in 1946, the disease remained local (see fig. 2).
2. Sap from stem-mottle diseased Bevelander potato, infected also with virus X, caused the same local symptoms, but the X-virus alone became systemic.
3. Sap from recovered Bevelander gave no local lesions. It was concluded that such plants are really virus-free and that it is not a question of masking.

4. The stem-mottle virus from Beteka potato caused the same local symptoms on tobacco after 4 days as that from Bevelander; 6 days later systemic symptoms appeared and were identical with those produced by the rattle virus; the incubation period was also the same. The fact that the diseases have identical symptoms is evident from comparing figures 3 and 5, and 5 and 7.
5. Sap from stem-mottle diseased Magneto potato, infected also with virus X, caused local lesions after 3 days; a week later the first systemic symptoms appeared. The leaf above the inoculated ones showed typical rattle symptoms (see fig. 6) and the younger leaves showed mottling, some necrotic spots, a severe vein-clearing and small yellow markings. The differences from the typical rattle symptoms obviously result from the combination with X-virus. In this instance it is justifiable to speak of a „complex" disease.
6. Sap from stem-mottle diseased Duke of York produced local lesions similar to those of rattle disease, the X-virus alone becoming systemic.

It is evident from these experiments that the stem-mottle disease and the rattle disease are related, if not identical. It is also evident that different strains exist.

The following experiments with potato plants confirm these conclusions. The sources of virus used were:

1. stem-mottle diseased Bevelander;
2. stem-mottle diseased Beteka;
3. stem-mottle diseased Magneto, infected also with virus X;
4. stem-mottle diseased Duke of York, infected also with virus X.

Sap from these plants inoculated on to leaves of the potato varieties Duke of York, Bevelander and Beteka caused local necrotic streaks, arcs and rings.

Identical symptoms resulted when leaves of the same potato varieties were inoculated with the rattle virus (see fig. 8, 9, 10, 11 and 12).

It is curious that all varieties reacted only with local symptoms; only the variety Beteka, inoculated with sap from Duke of York and Magneto, showed systemic symptoms, but these were due tot the virus X that was present in these varieties.

The progeny from the inoculated plants showed no symptoms of stem-mottle disease.

It is not clear why the stem-mottle and the rattle viruses remained localized in these experiments. HANSEN (2) mentioned that a potato plant of the variety King Edward, grafted with a stripe and curl diseased (Streg-Krollesyge) tobacco scion, showed on the young leaves of several shoots a few dark-brown necrotic spots. Tobacco plants inoculated with sap from those leaves reacted within 6 days with typical rattle symptoms. BÖNING (1) stated that the stripe and curl disease was not transmissible to potato, but it is possible (if the stripe and curl disease of BÖNING is identical with the rattle disease) that BÖNING did not use a suitable potato variety, or that conditions were not good for the inoculation. In this connection it should be mentioned that inoculation experiments carried out by the authors during July 1947 with sap from the above-named stem-mottle diseased potato varieties and with sap from a rattle diseased tobacco plant on the varieties Bevelander and Duke of York were less successful than those carried out in October.

It was obvious from these experiments that the rattle virus belongs to the group of the stem-mottle viruses of the potato plant. The following facts are also worth noting. In 1947, tubers from several stem-mottle susceptible potato varieties were planted alternate with healthy tobacco plants in a field where the tobacco crop had suffered severely from rattle disease during the summer of 1946. No stem-mottle or rattle symptoms appeared in 1947. Some of the harvested tubers, in which symptoms of spraing were distinct, were planted in 1948 on a plot in the experimental field of the Laboratory for Mycology and Potato Research, where the stem-mottle virus does not occur in the soil. It is remarkable that during the summer of 1948 the results summarized in Table 1 were obtained.

It is possible that the freedom from symptoms of the plants of the last three varieties in Table 1 may be explained by the fact that they are early varieties. From the fact that in 1947 no variety showed any stem-mottle symptoms, it may concluded that infection took place only late in the growing period. At that time, apparently, the plants were too old to react with leaf symptoms. The observation that all diseased plants (with the exception of 2 plants of the variety Bevelander) showed only partial stem-mottle symptoms also indicated a late infection.

It may be concluded from these field experiments that potatoes planted on soil contaminated with rattle virus may become affected with the stem-mottle-disease.

Similarly, experiments were carried out with tobacco and potato (variety Duke of York) plants grown in soil infected with stem-mottle virus. The soil was taken from three different plots (A, B and C) and at two depths (0–22 cm and 22–45 cm). For comparison, potatoes were planted and tobacco was sown in soil from a field where the tobacco crop was affected with the rattle disease the year before (indicated in Table 2 as D). The potato plants, grown in pots, all remained healthy. The tobacco plants, transplanted from these soil samples to a field where neither tobacco nor potatoes had been grown before, gave the results summarized in Table 2.

It may be concluded that the virus occurs not only in the upper layer of the soil, but also in the deeper layer tested.

LITERATUUR

1. Böning, K., Zur Aetiologie der Streifen- und Kräuselkrankheit des Tabaks. Zeitschr. Parasitenk. 3: 103–141, 1931.
2. Hansen, H. P., Undersøgelser og Iagttagelser over Tobaksviroser i Danmark. Tidsskr. Planteavel 50: 191–298, 1946.
3. Quanjer, H. M., Bijdrage tot de kennis van de in Nederland voorkomende ziekten van tabak en van de tabaksteelt op kleigrond. Tijdschr. Pl. ziekten 49: 37–51,1943.
4. Rozendaal, A., Ziekten van het stengelbont-type bij de aardappel. Tijdschr. Pl.ziekten 53: 93–101, 1947.
5. Smith, K. M., A textbook of plant virus diseases. London, 1937.
6. Want, J. P. H. van der, en A. Rozendaal, Electronenmicroscopisch onderzoek van het virus, dat de ratelziekte van de tabak en het stengelbont van de aardappel veroorzaakt. Tijdschr. Pl.ziekten 54: 134–141, 1948.

ELECTRONEN-MICROSCOPISCH ONDERZOEK VAN HET VIRUS, DAT DE RATELZIEKTE VAN DE TABAK EN HET STENGELBONT VAN DE AARDAPPEL VEROORZAAKT [1][2]

With a summary: An electron microscope study of the virus causing rattle disease of tobacco and stem-mottle of potato

DOOR

Ir J. P. H. VAN DER WANT en Ir A. ROZENDAAL

(Laboratorium voor Mycologie en Aardappelonderzoek, Wageningen) [3]

INLEIDING

Door ROZENDAAL en VAN DER WANT (5) werd op grond van vergelijkende besmettingsproeven bij tabaks- en aardappelplanten en na vergelijking van de etiologie der beide ziekten, geconcludeerd, dat de ratelziekte van de tabak en het stengelbont van de aardappel door hetzelfde virus worden veroorzaakt. Voorts toonden zij aan, dat van dit virus verschillende stammen voorkomen, die zich onderscheiden door de symptomen, veroorzaakt op enkele waardplanten

Enige stammen van dit virus zijn met behulp van de electronenmicroscoop te Delft onderzocht.

De bestudering van plantenviren met de electronenmicroscoop is de laatste jaren vooral in de Angelsaksische landen belangrijk toegenomen. Het ligt niet in de bedoeling deze onderzoekingen alle te beschrijven. Slechts zij hier vermeld, dat STANLEY en medewerkers (4 en 6) de lengte van de deeltjes van het tabaksmozaïekvirus met de electronenmicroscoop hebben vastgesteld, terwijl CROOK en SHEFFIELD (3) de aggregatie van hetzelfde virus bestudeerden. TAKAHASHI en RAWLINS (7) vonden, dat de deeltjes van twee „strains" van het aardappel X-virus, die symptomatologisch duidelijk te onderscheiden zijn, niet wezenlijk in grootte verschillen. Dezelfde onderzoekers (8) constateerden hetzelfde voor twee „strains" van het tabaksmozaïekvirus.

MATERIAAL EN METHODEN

Om plantenviren met de electronenmicroscoop zichtbaar te maken is het vereist, het perssap van viruszieke planten te zuiveren. Het doel hiervan is, sapbestanddelen te verwijderen, die hinderlijk zijn, doordat zij de virusdeeltjes overdekken en aldus onzichtbaar maken. Deze zuivering kan soms in voldoende mate worden bereikt door het neerslaan van het chlorophyl in een centrifuge bij 3500 toeren per minuut. Dit neerslaan wordt bevorderd door de viruszieke planten vóór het uitpersen te bevriezen of door het perssap van zieke planten te verhitten tot 60 °C gedurende 10 minuten. De laatste methode is slechts bruikbaar als het thermale inactiveringspunt van het te onderzoeken virus boven 60 °C ligt. In beide gevallen bereikt men een coagulatie van het chlorophyl, waardoor dit zich sneller laat afcentrifugeren.

[1]) Ontvangen voor publicatie Juli 1948.

[2]) De foto's werden vervaardigd met de electronenmicroscoop van de Technisch Physische Dienst T.N.O. en T.H., afd. Electronenmicroscopie te Delft.

[3]) Onderzoek, bekostigd door de afdeling Tuinbouwkundig Onderzoek van de Directie van de Tuinbouw te 's-Gravenhage.

Van het aldus helder gemaakte sap kan men doorgaans echter niet zonder meer preparaten voor de electronenmicroscoop vervaardigen. Het bevat nog, naast eiwitten en koolhydraten, minerale bestanddelen, welke een belemmering voor het zichtbaar maken van de virusdeeltjes kunnen vormen. Soms voldoet een verdunning van het van chlorophyl bevrijde sap met gedestilleerd water, doch de kans een fraai preparaat te verkrijgen, waar behoorlijke foto's van gemaakt kunnen worden, is ook dan nog gering.

Een verbetering verkrijgt men door na de verwijdering van het chlorophyl de zuivering voort te zetten en het virus neer te slaan met ammoniumsulfaat of met andere chemicaliën (1).

Dit kan echter een bezwaar vormen, daar door deze bewerking de kans op aggregatie van virusdeeltjes groter wordt, hetgeen vnl. van betekenis is bij de staafvormige viren. Hierop is vooral door BAWDEN en PIRIE (2) gewezen.

Aggregatie van virusdeeltjes kan eveneens optreden als men het virus met de ultracentrifuge tracht te zuiveren.

Het komt dus hier op neer, dat men experimenteel voor elk virus afzonderlijk een zuiveringsmethode dient te vinden, die de virusdeeltjes in een toestand laat, waarin zij verkeerden tijdens het uitpersen van het plantenmateriaal.

Van het gezuiverde en eventueel verdunde virushoudende sap werd een druppeltje op de membraan van de preparaathouder gebracht; het virus werd hierna aan de lucht gedroogd. Enkele dagen hierna werden de preparaathouders naar Delft overgebracht, waar zij volgens de techniek van het „shadow-casting" met een goudlaagje werden bedekt. Daarna werden de preparaten met de electronenmicroscoop onderzocht en foto's vervaardigd.

Voor het onderzoek van het ratelvirus en het stengelbontvirus werden de bovengeschetste zuiveringsmethoden (behalve die met de ultracentrifuge) toegepast. In een vorige publicatie (1) is beschreven hoe het ratelvirus van de tabak gezuiverd kan worden. Na verhitting op 60 °C van het perssap van ratelzieke tabaksplanten gedurende 10 minuten, gevolgd door afcentrifugeren van het chlorophyl wordt per 100 cm^3 helder sap 25 g ammoniumsulfaat toegevoegd. Het neerslag, dat hierbij ontstaat en dat het virus bevat, wordt afgecentrifugeerd en na afschenken van de bovenstaande heldere vloeistof in een geringe hoeveelheid water opgenomen. Zwevende bestanddelen worden vervolgens afgecentrifugeerd, waarna de virushoudende vloeistof gedurende 12 uur gedialyseerd wordt t.o.v. leidingwater en daarna een even lange tijd t.o.v. gedestilleerd water. Van het aldus gezuiverde virus kunnen, eventueel na verdunning, bevredigende opnamen worden gemaakt.

Dezelfde zuiveringsmethode werd toegepast op het sap van stengelbontziek aardappelloof van de rassen Beteka, Bevelander, Magneto en Eersteling en op sap van tabaksplanten, die besmet waren met stengelbontvirus van verschillende herkomst. Het bleek uit inoculatieproeven op tabaksplanten, dat het stengelbontvirus de zuivering, zonder merkbare verandering in virulentie, weerstond. Tevens volgde uit deze infectieproeven, dat zich in de gezuiverde preparaten van het stengelbontvirus van de herkomst Magneto en dat van de herkomst Eersteling tevens aardappel-X-virus bevond. Zoals bekend, is het ras Eersteling carrier van dit laatste virus en uit de proeven, beschreven in een vorige publicatie (5) was gebleken, dat de Magneto-plant niet alleen met stengelbontvirus, doch ook met X-virus besmet was.

Na de zuivering werden de gezuiverde viruspreparaten gedurende $2\frac{1}{2}$ maand

bij 0° tot 2 °C bewaard. Hierna waren zowel het ratelvirus en de verschillende stengelbontviren als het X-virus nog steeds virulent, hetgeen volgde uit inoculatieproeven op tabaksplanten.

Ter contrôle werd ook sap van gezonde tabaks- en aardappelplanten langs chemische weg gezuiverd. Het gezuiverde sap van „gezonde" Eersteling bleek slechts X-virus te bevatten, evenals het gezuiverde sap van een Magnetoplant, die van stengelbont was genezen.

RESULTATEN VAN HET ELECTRONENMICROSCOPISCH ONDERZOEK

Ratel- en stengelbontviruspreparaten, die volgens de chemische methode gezuiverd waren en korte tijd daarna onderzocht werden, bleken rechte, staafvormige deeltjes te bevatten, waarvan de lengte per preparaat varieerde. In de Eersteling- en Magneto-preparaten werden bovendien draadvormige min of meer gegolfde deeltjes waargenomen. De preparaten van de gezonde tabaks- en aardappelplanten bevatten de staafvormige deeltjes niet en evenmin de draadvormige,

Fig. 1. Electronenfoto, gemaakt met de electronenmicroscoop te Delft. Staafvormige stengelbontvirusdeeltjes en draadvormige X-virusdeeltjes, afkomstig van een aardappelplant, ras Magneto.
Photomicrograph made with the electron microscope at Delft (Holland). Rod-shaped particles of the stem-mottle virus and curled, thread-like particles of the X-virus from a potatoplant of the variety Magneto.

Fig. 2. Electronenfoto's, gemaakt met de electronenmicroscoop te Delft.
A. Ratelvirusdeeltjes. B. Deeltjes van het stengelbontvirus, herkomst Bevelander.
Photomicrographs made with the electron microscope at Delft (Holland).
A. Particles of the rattle virus. B. Particles of the stem-mottle virus, Bevelander strain.

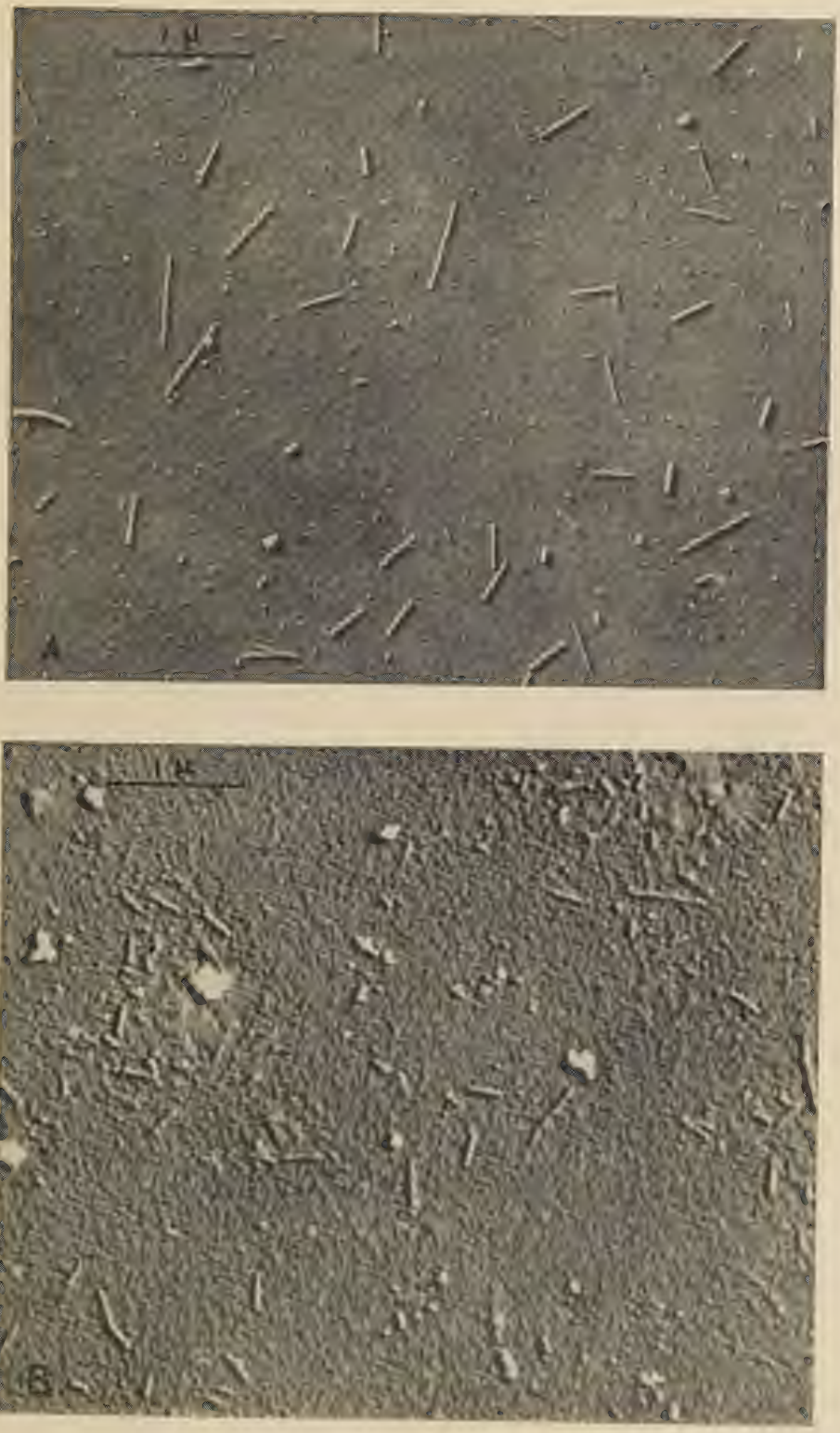

Fig. 2. Verklaring zie hiernaast.

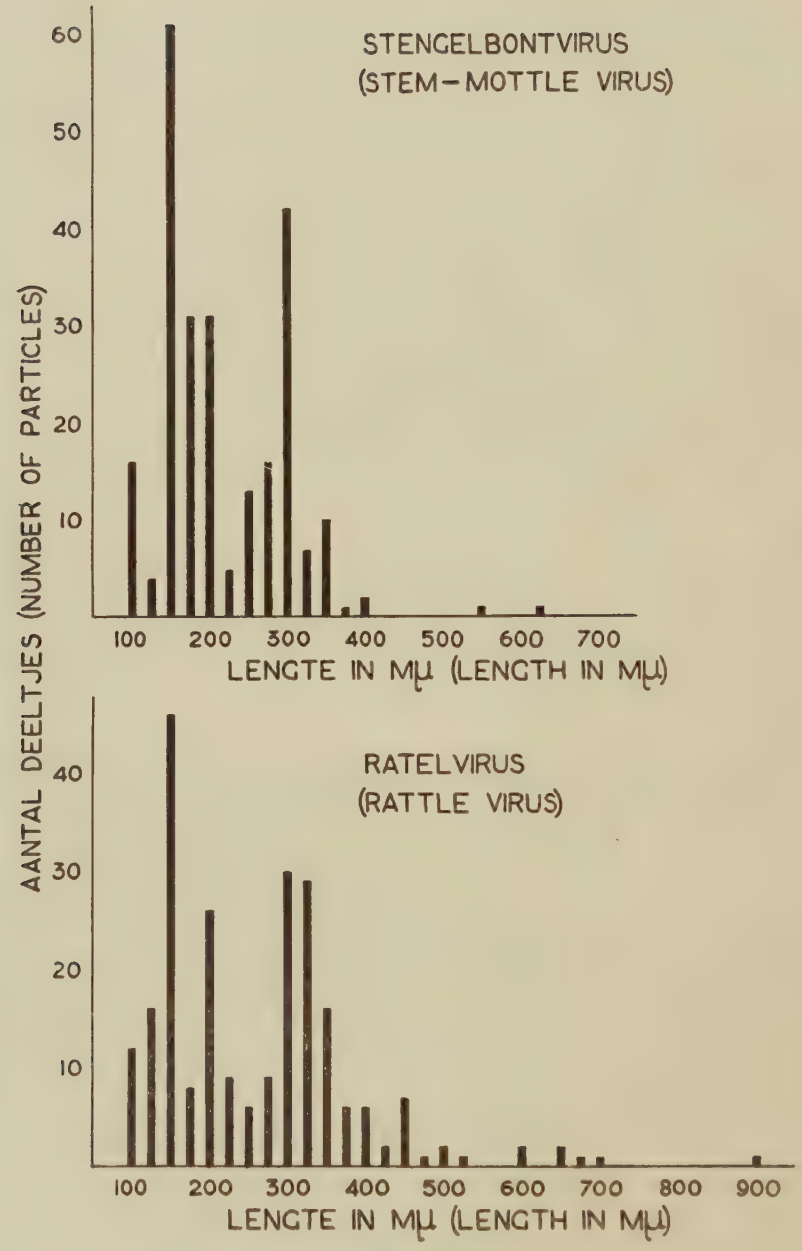

Fig. 3. Grafische voorstellingen van de lengte van 239 ratelvirusdeeltjes en 241 deeltjes van het stengelbontvirus, herkomst Bevelander.
Length distribution curves of 239 particles of the rattle virus and 241 particles of the stem-mottle virus, Bevelander strain.

gegolfde deeltjes. Deze laatste kwamen echter wel voor in de preparaten van de „gezonde" Eersteling en van de Magnetoplant, die van stengelbont was genezen. Men kan hieruit concluderen, dat de draadvormige partikels het X-virus vertegenwoordigen; ze komen overeen met de deeltjes, die TAKAHASHI en RAWLINS (7) in het sap van met aardappel-X-virus besmette tabaksplanten waarnamen. Voorts wijzen onze waarnemingen er op, dat de rechte, staafvormige deeltjes in de preparaten van ratel- en stengelbontzieke planten het ratel-stengelbontvirus vertegenwoordigen.

Electronenmicroscopisch onderzoek van de viruspreparaten, die 2½ maand bij 0° tot 2 °C bewaard waren, toonde aan dat de lengte der ratel- en stengelbontvirusdeeltjes gedurende die tijd niet merkbaar veranderd was. Wel waren de X-virusdeeltjes, afkomstig van Magneto en Eersteling, belangrijk langer geworden; deze deeltjes waren blijkbaar voor het belangrijkste gedeelte tot grotere geaggregeerd. Figuur 1 geeft een foto van het viruspreparaat van Magneto: de geaggregeerde X-virusdeeltjes, die als een verwarde hoop draadjes bij elkaar liggen, zijn duidelijk te onderscheiden; daartussen bevinden zich enkele stengelbontvirusstaafjes.

In een tweede onderzoek werd het sap van *Nicotiana rustica*-planten, respectievelijk besmet met ratelvirus, afkomstig van *Nicotiana tabacum* en stengelbontvirus, afkomstig van het aardappelras Bevelander, zonder chemische middelen snel gezuiverd van chlorophyl. Volgens het symptomatologisch onderzoek (5) betrof het hier twee virusstammen, die duidelijk van elkaar verschillen met betrekking tot hun gedrag t.o.v. *Nicotiana tabacum*. De *N. rustica*-planten waren vóór het uitpersen gedurende een nacht bewaard bij –20 °C. Het perssap van deze planten werd bij 3500 toeren per minuut gedurende ongeveer 20 minuten gecentrifugeerd. De gedecanteerde heldere vloeistoffen werden direct hierna onverdund en in de verdunningen 1 : 10 en 1 : 50 met gedestilleerd water op de membranen van de preparaathouders gebracht. Electronenmicroscopisch onderzoek leverde het volgende op: in de onverdunde preparaten waren geen virusdeeltjes zichtbaar, er bevond zich nog te veel storend materiaal in. De verdunningen gaven betere resultaten; hiernaar zijn de foto's van figuur 2 gemaakt.

Van het ratelvirus werden 239 staafjes gemeten en van het stengelbontvirus herkomst Bevelander 241 staafjes. Naast deze staafjes zijn op de foto's hier en daar min of meer bolvormige deeltjes met een diameter van ongeveer 25 mμ te zien. Het is mogelijk, dat deze in betrekking staan tot het virus; een andere mogelijkheid is, dat zij normale celbestanddelen vertegenwoordigen. Slechts staafvormige deeltjes werden gemeten en hiernaar zijn de grafieken in fig. 3 opgesteld.

Bij de beschouwing van deze grafieken dient men te bedenken, dat de metingen van de deeltjes met een in mm verdeelde lineaal zijn verricht, waarbij de lengte tot op een halve mm geschat kon worden. Voorts zijn de deeltjes op de foto's niet steeds scherp begrensd, waardoor de metingen niet altijd even nauwkeurig kunnen geschieden. Bovendien zijn de aantallen gemeten deeltjes aan de lage kant. Men dient dus de betrekkelijkheid van deze grafieken in het oog te houden. Eén conclusie is echter wel te trekken. Beide grafieken zijn twee-toppig: één top ligt bij circa 150 mμ en één bij circa 300 mμ. Voorts is er een aanwijzing, dat in het algemeen het ratelvirus meer grotere deeltjes bevat dan het stengelbontvirus, herkomst Bevelander, m.a.w. de variatie-breedte van de lengte der ratelvirusdeeltjes zou groter zijn.

De verklaring van het feit, dat de foto van het stengelbontvirus minder

scherp is dan die van het ratelvirus ligt hierin, dat de laatste gemaakt is bij een sterkere electronenmicroscopische vergroting dan de eerste. Teneinde vergelijkbare foto's te verkrijgen moest dus de opname van het stengelbontvirus langs fotografische weg sterker vergroot worden dan die van het ratelvirus.

Het lijkt alsof de breedte van de virusdeeltjes op de foto's tamelijk varieert. Dit is in werkelijkheid waarschijnlijk echter niet het geval. Volgens Dr A. L. Houwink te Delft is de verklaring de volgende: de virusdeeltjes liggen schots en scheef over het veld verspreid, waardoor de „schaduwen", die zij ten gevolge van het „shadow-casting" werpen, niet alle even groot zijn, hetgeen de indruk maakt alsof de breedte der deeltjes (respectievelijk de hoogte) wisselt.

Naar schatting zijn de deeltjes circa 20 mμ breed.

Amerikaanse (6, 8) auteurs achten het blijkbaar verantwoord, naar aanleiding van electronenmicroscopische opnamen, de afmetingen der virusdeeltjes tot op mμ nauwkeurig te vermelden. Uit dit onderzoek is echter gebleken, dat men van deze afmetingen slechts een globale indruk kan verkrijgen, m.a.w. men dient zich steeds van de relatieve waarde der verkregen gegevens bewust te zijn. Dit houdt evenwel niet in, dat de resultaten van het electronenmicroscopisch virusonderzoek voor de kennis der viren niet van grote betekenis zou zijn.

SUMMARY

In a previous paper (5) the writers showed that the rattle disease of tobacco and the stem-mottle disease of potato are caused by the same virus. Of this virus some strains exist. In the following the strain of this virus, derived from tobacco is still called rattle virus and the strains from potato, stem-mottle virus.

Sap from tobacco plants *(Nicotiana tabacum and N. rustica)* inoculated with rattle virus was purified in two different ways for examination under the electron microscope. 1. The virus was chemically purified by salting out with ammonium sulphate (see Reference 1). 2. In a quicker method the plants were kept overnight at –20 °C; after thawing, the sap was expressed and centrifuged at 3500 r.p.m. The clear, chlorophyll-free sap was then mounted directly on the membranes, either undiluted or in the dilutions 1 : 10 and 1 : 50, and dried in the air. The mounted viruses were prepared with gold by the shadowcasting technique and studied with the electron microscope at the „Technisch Physische Dienst" T.N.O. en T.H. at Delft.

The stem-mottle virus of potato, also, can be concentrated with the aid of ammonium sulphate without losing its infectivity. This method and the quick one were used on sap from the leaves of potato plants of the varieties Beteka, Bevelander, Duke of York and Magneto, all infected with stem-mottle virus. It should be mentioned that the variety Duke of York is a symptomless carrier of potato virus X and that inoculation experiments showed that the Magneto plant also was infected with potato virus X. Stem-mottle virus from these four sources was also inoculated into *N. tabacum* and *N. rustica* plants, and the sap was purified in the two ways mentioned.

Electron microscopy of these virus preparations gave the following results:

1. Rattle and stem-mottle virus particles were found to be rodshaped; the length of the rods varied in each preparation. In the preparations of the stem-mottle virus from the potato varieties Duke of York and Magneto, thread-like, curled X-virus particles, as shown by Takahashi and Rawlins (7), were seen. These were easily distinguishable from the rods of the stem-mottle virus.

2. No obvious aggregation of rattle and stem-mottle virus particles took place during 2½ months' storage of the chemically purified sap kept at 0°–2 °C. On the other hand there was a distinct aggregation of the X-virus particles in the same period (see fig. 1).

3. Rattle and stem-mottle virus rods were found to have the same appearance whether the sap of diseased plants was purified by the chemical method or by the quick method.

Sap from *N. rustica* plants inoculated either with the rattle virus of tobacco or the stem-mottle virus of potato, var. Bevelander, which produce very different symptoms on *N. tabacum* (5), was purified by the quick method and photographed under the electron microscope. Photomicrographs of the particles of both viruses are reproduced in fig. 2. The lengths of 239 particles of the rattle virus and 241 particles of the stem-mottle virus were measured from the photographs. The measurements were made with a ruler divided in mm., the lengths of the particles being taken to the nearest half mm. Not all particles were sharply defined, so the measurements were not always exact; moreover, the number of particles measured was on the low side, so that the distribution curves have only a relative value. Nevertheless, we may conclude that there are two peaks in the distribution curves for particles length of both viruses, viz. one at about 150 mμ and one at about 300 mμ. It was not possible to determine the width of the virus particles exactly, but it was estimated to be about 20 mμ.

In addition to the rod-shaped particles, some globular particles were seen, but it is doubtful whether they are related to the viruses.

According to American authors (6, 8) it should be possible to determine the dimensions of virus particles in mμ exactly, from electron photomicrographs. This investigation shows, however, that exact measurements of particle dimension cannot always be made by electron microscopy.

LITERATUUR

1. Algera, L., T. H. Thung en J. P. H. van der Want, Over het zuiveren van plantenviren. Tijdschr. Pl.ziekten 53: 133–139, 1947.
2. Bawden, F. C. and N. W. Pirie: The separation and properties of tobacco mosaic virus in different states of aggregation. Brit. J. Exper. Path. 26: 294–315, 1945.
3. Crook, E. M. and F. M. L. Sheffield, Electron-microscopy of viruses. I. State of aggregation of tobacco mosaic virus. Brit. J. Exp. Path. 27: 328–338, 1946.
4. Oster, G. and W. M. Stanley. An electron microscope study of the contents of hair cells from leaves diseased with J. tobacco mosaic virus. Brit. Exper. Path. 27: 261– 265, 1946.
5. Rozendaal, A. en J. P. H. van der Want, Over de identiteit van het ratelvirus van de tabak en het stengelbontvirus van de aardappel. Tijdschr. Pl. ziekten 54: 113–133, 1948.
6. Sigurgeirsson, T. and W. M. Stanley, Electron microscope studies on tobacco mosaic virus, Phytopath. 37: 26–38, 1947.
7. Takahashi, W. N. and T. E. Rawlins, An electron microscope study of two strains of potato X virus. Amer. J. Bot. 33: 740–742, 1946.
8. Takahashi, W. N. and T. E. Rawlins, An electron microscope study of mutation in tobacco-mosaic virus. Phytopath. 37: 73–76, 1947.

THIELAVIOPSIS BASICOLA (BERK. ET BR.) FERRARIS ALS VEROORZAKER VAN EEN VOOR NEDERLAND NIEUWE ZIEKTE VAN DE TABAK [1])

With a summary: Thielaviopsis basicola (Berk. et Br.) Ferraris the cause of a tobacco disease, new for the Netherlands

DOOR

Ir R. VAN DER VEN

(Stichting Proeftuin voor Tabak, Wageningen)

EN

Ir J. P. H. VAN DER WANT

(Tuinbouwkundig onderzoek,
verricht aan het Lab. v. Mycologie en Aardappelonderzoek, Wageningen)

INLEIDING

Op de assistentenvergadering van de Rijkstuinbouwvoorlichtingsdienst voor Tabaksaangelegenheden op 26 Mei jl. werden door de assistent E. ELBERS tabaksplantjes meegebracht, die eigenaardige afwijkingen aan het wortelstelsel vertoonden. Dit was door hem waargenomen in de zaaibakken van verscheidene planters in het Land van Maas en Waal, nl. te Puiflijk en Boven-Leeuwen, vooral in het ras Kentucky Italiana. Echter kwam dit verschijnsel, zij het in mindere mate, ook in de rassen Havanna II C, Maas en Waalse, Keurhorst Elite en Mont Calme brun voor. De aantasting had een dusdanige omvang aangenomen, dat vele zaaisels dreigden te mislukken.

Aangezien dit ziekteverschijnsel ons onbekend was, werd een nader onderzoek ingesteld.

ZIEKTEBEELD

Deze ziekte is door ons reeds in de zaaibakken waargenomen toen de tabaksplantjes ongeveer drie weken oud waren. De groei stagneerde toen, terwijl de onderste blaadjes naar geel begonnen te verkleuren. De hartblaadjes bleven er evenwel normaal uitzien. Werden deze plantjes uit de grond getrokken, dan bleken het wortelstelsel en de wortelhals bruin verkleurd te zijn. In ernstige gevallen was van de penwortel weinig meer dan een klein bruin stompje over, terwijl ook de zijwortels geheel afgestorven waren of donkerbruine vlekken vertoonden. Vaak was ook het onderste gedeelte van de stengel bruin verkleurd. In sommige gevallen had de plant boven de aangetaste wortels nieuwe zijwortels gevormd, waardoor zij haar leven trachtte te rekken. Fig. 1 geeft een duidelijk beeld van deze symptomen.

Dergelijke kwijnende planten waren door een aantal tabakstelers op het veld uitgeplant. Deze planten waren na 3 weken niet veel groter geworden. Ze vertoonden de ziekteverschijnselen, die in de zaaibakken optraden, in nog heviger mate: geelgroene verkleuring der onderste blaadjes, die doorgaans slap hingen. De hartblaadjes behielden het langst een gezonde kleur. Bij zeer ernstige aantasting stierven de planten af, zodat tot inboeten moest worden overgegaan.

[1]) Ontvangen voor publicatie Juni 1948.

Fig. 1. Tabaksplantjes, aangetast door *Thielaviopsis basicola;* in het midden gezond plantje.
Young tobacco plants, affected by Thielaviopsis basicola; healthy plant in the centre.

Door één planter moest ongeveer 70 % van de planten worden ingeboet, terwijl het van de overige planten twijfelachtig was of zij het leven zouden behouden. In dit geval was de besmetting in de zaaibakken ongeveer 100 % geweest.

ZIEKTEOORZAAK

Bij microscopisch onderzoek van zieke worteltjes viel het voorkomen van dikwijls grote aantallen donkergekleurde meercellige sporen op (zie fig. 2A).

Het gelukte uit de aangetaste wortels een schimmel te isoleren, die gemakkelijk geïdentificeerd kon worden als *Thielaviopsis basicola* (Berk. et Br.) Ferraris. Op kunstmatige voedingsbodems vormde deze schimmel zeer veel hyaline endosporen, terwijl na verloop van tijd ook de donkere chlamydosporen ontstonden, die reeds in de microscopische preparaten van de aangetaste wortels waren waargenomen (zie fig. 2B).

Hoewel met deze geïsoleerde schimmel nog geen inoculatieproeven werden uitgevoerd, was het na dit onderzoek niet twijfelachtig meer dat *T. basicola* inderdaad de veroorzaker van de hierboven beschreven ziekteverschijnselen was.

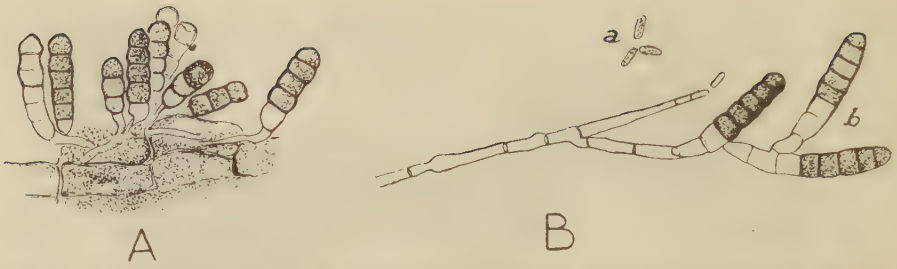

Fig. 2. A. Chlamydosporen van *Thielaviopsis basicola,* tevoorschijn komend uit een aangetast worteltje.
B. Thielaviopsis in reincultuur; endosporen (a) en chlamydosporen (b).
Vergr. 250 maal
A. *Chlamydospores of Thielaviopsis basicola on the periphery of an affected root.*
B. *Thielaviopsis in pure culture; endospores (a) and chlamydospores (b).*

Deze symptomen komen ook volkomen overeen met die, welke in de literatuur worden beschreven en het is bekend, dat deze parasiet in vele tabaksstreken ter wereld belangrijke schade kan veroorzaken (Wolf, 12). Uit Zwitserland wordt gemeld, dat de cultuur van Burley-tabak in Tessino hierdoor vrijwel onmogelijk werd gemaakt (Heuszer, 6).

De schimmel, die in de oudere literatuur *Thielavia basicola* (Berk. et Br.) Zopf wordt genoemd, staat tegenwoordig doorgaans bekend als *Thielaviopsis basicola* (Berk. et Br.) Ferraris. Het is nl. twijfelachtig of de peritheciumvorm (*Thielavia*), die dikwijls in de wortels van aangetaste planten wordt aangetroffen, wel behoort bij de vorm, die endosporen en chlamydosporen produceert (*Thielaviopsis*). Door Ferraris zijn dan ook de sexuele en de asexuele vormen van elkaar gescheiden (Tiddens, 11).

In een uitvoerig onderzoek van Johnson (8) is komen vast te staan, dat *T. basicola* een uitermate polyphage parasiet is; hij kon een groot aantal (ongeveer 100) plantensoorten, behorende tot uiteenlopende families, met deze schimmel infecteren.

Latere onderzoekingen, o.a. van Tiddens (11) en Rawlings (10) hebben aangetoond, dat er physiologische rassen van *T. basicola* voorkomen. Deze rassen onderscheiden zich niet alleen in een verschillende groeiwijze en groeisnelheid op diverse kunstmatige voedingsbodems, doch tevens in de mate, waarin zij verschillende planten kunnen aantasten. Zo vond Tiddens, dat bonenplanten wel hevig werden aangetast door een isolatie van *T. basicola* van *Poinsettia*, doch minder door een isolatie, afkomstig van tabak.

Over de omstandigheden, waaronder de ziekte optreedt, zijn door Amerikaanse onderzoekers (1, 3 en 9) belangrijke gegevens verzameld. Hieruit blijkt, dat de hevigste aantasting bij bodemtemperaturen tussen 17° en 23 °C plaats heeft. Boven 26 °C trad weinig of geen infectie op, terwijl bij 30 °C en hogere temperaturen in het geheel geen ziekte waargenomen kon worden. Zo is het mogelijk, dat zeer zieke tabaksplanten zich bij stijging van de temperatuur tot 30 °C of daarboven herstellen. Wellicht ligt hierin de oorzaak van het feit, dat deze ziekte alleen betekenis heeft in de gematigde luchtstreken en niet in de tropen.

Ook is gebleken, dat in stijve, zware gronden de aantasting heviger is dan in lichte, zandiger gronden.

Voorts is gevonden, dat de zuurgraad van de bodem eveneens een belangrijke invloed heeft op de mate van aantasting door *T. basicola*. In gronden met een pH van 5,6 of lager werd weinig of geen aantasting waargenomen. Bij hogere pH werd daarentegen de schade belangrijker.

VATBAARHEID DER TABAKSRASSEN

Uit proeven, die vnl. in Amerika op grote schaal zijn genomen, is gebleken, dat er belangrijke verschillen in vatbaarheid tussen uiteenlopende tabaksrassen bestaan. Zo bleken White Burley-, Oronoco-, Pryor- en Maryland-typen het vatbaarst te zijn, terwijl Little Dutch- en Connecticut Broadleaf-typen het meest resistent waren (JOHNSON, 7). HEUSZER (6) deelt mede, dat in Zwitserland White Burley het vatbaarst, Mont Calme jaune minder vatbaar, Paesana betrekkelijk resistent en Mont Calme brun practisch resistent is.

Volgens CONANT (2) bestaat het verschil in resistentie hierin, dat de resistente rassen reeds bij lagere temperatuur in staat zijn kurk in de wortelschors te vormen, waar de parasiet niet verder doorheen kan dringen. In de gevoelige rassen zou deze kurkvorming pas bij hogere temperatuur optreden.

In de verslagen van het Kentucky Agricultural Experiment Station van de laatste jaren wordt o.a. vermeld dat nieuwe Burley-typen zijn gewonnen, die zeer resistent zijn tegen *T. basicola* en die tevens hoge opbrengsten geven en een goede kwaliteit tabak leveren. Ook uit Canada wordt bericht, dat goede resistente rassen zijn geselecteerd (HASLAN, 4).

Over de resistentie van de tabaksrassen, behorende tot het Nederlandse sortiment, bezitten we nog geen gegevens, al is het duidelijk, dat Kentucky Italiana zeer vatbaar is en voor verdere verbouw niet meer in aanmerking komt. Nader onderzoek zal ons hierover dienen in te lichten.

BESTRIJDING

Uit het bovenstaande blijkt, dat bij hevige aantasting door *T. basicola* de planten practisch waardeloos zijn. Blijven de planten in het leven doordat zij nieuwe wortels vormen — hetgeen in hoge mate afhankelijk is van bodem- en weersomstandigheden — dan blijven zij in het algemeen toch kleiner dan normale planten en geven zij hierdoor een geringere opbrengst.

De bestrijding dient zich dus te richten op preventieve maatregelen:

1. Ontsmetting van de zaaibakken door stomen of koken van de bakgrond. Volgens HENDERSON (5) kan men de schimmel in de bakken ook bestrijden door een bemesting met ureum naar een hoeveelheid van ongeveer 300 gram per m^2 ($\frac{1}{2}$ lb. per square yard).
2. Het gebruik van gezond plantgoed; aangetaste tabaksplanten geven niet alleen een geringere opbrengst, doch kunnen bovendien het tabaksland voor jaren besmetten.
3. Het toepassen van vruchtwisseling, dus niet jarenlang achtereen tabak op hetzelfde perceel verbouwen. Het beste kan men hierbij granen toepassen, daar deze onvatbaar zijn. Vatbare gewassen zijn o.a. klavers, lucerne, bonen, erwten en lupinen.
4. Men dient voorzichtig te zijn met het bekalken van de tabaksgronden.
5. Indien de tabaksgronden hevig besmet zijn kan alleen de verbouw van tegen *Thielaviopsis* resistente tabaksrassen uitkomst bieden.

SUMMARY

Tobacco black root rot, caused by *Thielaviopsis basicola* (Berk. et Br.) Ferraris, has been reported for the first time in the Netherlands. It occurred in tobacco seed beds in the Maas and Waal district, especially in the variety Kentucky Italiana.

A part of the literature on this subject is briefly discussed and methods for control are given.

LITERATUUR

1. Anderson, P. J., A. V. Osmun and W. L. Doran, Soil reaction and black root rot of tobacco. Mass. Agr. Exp. Stat. Bull. 229: 118–136, 1926.
2. Conant, G. H., Histological studies of resistance in tobacco to Thielavia basicola. Am. Journ. of Bot. 14: 457–480, 1927.
3. Doran, W. L., Effects of soil temperature and reaction on the growth of tobacco infected and uninfected with black root rot. Journ. Agr. Res. 39: 853–872, 1929.
4. Haslam, R. J., Harrow resistant Broadleaf Burley. Lighter (Dep. Agr. Can.) 15: 14, 1945. Zie Rev. Appl. Myc. 24: 341, 1945.
5. Henderson, R. G., Treatment of tobacco plant bed soil with nitrogenous fertilizers. Agric. News Lett. 1941: 72–78, 1941. Zie Rev. Appl. Myc. 21: 167, 1942.
6. Heuszer, C., Krankheiten und Schädlinge des Tabaks. Mitt. der Forschungs- und Beratungsstelle der SOTA 13: 62–81, 1944.
7. Johnson, J., Resistance in tobacco to the root rot disease. Phytopath. 6: 167–181, 1916.
8. Johnson, J., Hostplants of Thielavia basicola. Journ. Agr. Res. 7: 289–300, 1916.
9. Johnson, J. and R. E. Hartman, Influence of soil environment on the root rot of tobacco. Journ. Agr. Res. 17: 41–86, 1919.
10. Rawlings, R. E., Observations on the cultural and pathogenic habits of Thielaviopsis basicola (Berk. et Br.) Ferraris. Ann. Miss. Bot. Gard. 27: 561–598, 1940.
11. Tiddens, B. A., Wortelrot van Primula obconica veroorzaakt door Thielaviopsis basicola (Berk. et Br.) Ferraris. Diss. Utrecht, 1933.
12. Wolf, F. A., Tobacco diseases and decays. Durham, North Carolina, 1935, p. 258–269.

IN MEMORIAM
Dr PETHYBRIDGE

In Mei 1948 overleed op 76-jarige leeftijd Dr Geo H. Pethybridge, die als phytopatholoog de Landbouw van Groot Brittannië en Ierland grote diensten heeft bewezen. Vele jaren van zijn leven heeft hij het Proefstation voor Zaadcontrôle van Ierland te Dublin geleid. Hij bracht dan altijd een deel van de zomer aan de Westkust door, waar hij zijn belangrijke onderzoekingen over aardappelziekten verrichtte. Zo werden o.a. in 1913 door hem de oosporen van *Phytophthora infestans*, die hij in reincultuur gekweekt had, beschreven. In die zelfde tijd verscheen zijn mededeling over *Phytophthora erythroseptica* en later

over nog een Phytophthora, die de tomaat aantast. Maar ook over talrijke andere plantenziekten, en vooral over de ziekten van vlas, deed hij belangrijke rapporten verschijnen. In 1927 was hij voorzitter van de British Mycological Society en kort te voren was hij benoemd tot hoofd van de Mycologische afdeling van het Engelse Regeringslaboratorium voor Plantenziekten, waarvan de functie enigszins te vergelijken is met die van de Nederlandse Plantenziektenkundige Dienst.

PETHYBRIDGE vertegenwoordigde de landen, waar hij werkzaam was, dikwijls op buitenlandse Congressen en Conferenties. De schrijver dezer regelen had het voorrecht een reis door Amerika tezamen met hem te maken; daarbij heeft hij hem als een beminnelijk en geestig man en als een goed spreker leren waarderen.

PETHYBRIDGE heeft meegewerkt aan de redactie van enkele tijdschriften o.a. van het Journal of Pomology and Horticultural Science. Hij was een meester op taalkundig gebied en bracht dikwijls aanzienlijke verbeteringen aan in artikelen van minder ervaren schrijvers. Ook mocht ik hem in de Engelse taal geschreven referaten van voor het Tijdschrift over Plantenziekten bestemde artikelen steeds doen toekomen en hij zette dan ons min of meer onbeholpen Engels om in keurig gestyleerde „summary's". Mede namens de schrijvers, die daarvan gebruik hebben gemaakt om hun werk wereldkundig te doen worden, wil ik een woord van grote waardering toevoegen aan de hulde, die PETHYBRIDGE verdient om zijn vele ook voor ons land belangrijke onderzoekingen.

H. M. Q.

BOEKBESPREKING

WAKSMAN, S. A., *Microbial antagonisms and antibiotic substances. Revised edition*, New York. The Commonwealth Fund 1947 (330 blz. + 85 blz. bevattende een overzicht van de antibiotische stoffen ingedeeld naar de groepen van organismen, die ze voortbrengen: Bacteriën, Actinomyceten, Schimmels, Wieren, Hogere Planten en Dieren; verder een verklaring van vaktermen, een bibliographie met 1053 titels, een index van micro-organismen en een algemene index. Prijs $ 4.—).

Na in 1945 twee drukken te hebben beleefd, is dit boek in 1947 in herziene vorm verschenen. Het geeft de phenomenale uitbreiding der kennis op het gebied van antogonisme en antibiotica in overzichtelijke vorm weer. Niet alleen betreft die uitbreiding het penicilline, maar ook tal van andere vooral uit in de grond levende organismen afgescheiden antibiotica met overigens zeer verschillende eigenschappen o.a. wat betreft de stoffen, waarin zij oplosbaar zijn, hun bestandheid tegen de inwerking van zuren en alcaliën en tegen oxydatie; maar vooral in hun werking. Sommige antagonisten verhinderen andere organismen te groeien, andere tasten ze heftig aan met vergiften en er zijn er ook, die in andere organismen parasiteren. De antibiotica zijn min of meer selectief in hun werking op schimmels, bacteriën, dieren en de mens. Onder de voor de mens niet giftige zijn er, behalve penicilline, verschillende die van betekenis kunnen worden voor de bestrijding van ziekten. Sommige van deze stoffen worden slechts gevormd

door één of enkele organismen, andere worden door meer organismen gevormd. Er zijn antagonisten, die slechts één, er zijn er, die chemisch en biologisch verschillende antibiotica voortbrengen.

Uit de hier volgende opsomming van de hoofdstukken van het boek kan een indruk verkregen worden van zijn inhoud.

1. Grond en water als woonplaats van micro-organismen.
2. Menselijke en dierlijke afvalstoffen.
3. Betrekkingen tussen micro-organismen in gemengde populaties.
4. Isolatie en cultuur van antagonisten; methoden om hun antibiotische werking te meten.
5, 6, 7, 8, 9. Bacteriën, Actinomyceten, Schimmels, microscopische dieren en viren als antagonisten.
10. Chemische natuur van antibiotische stoffen.
11. De antibiotische werking.
12. Gebruik van antibiotische stoffen als geneesmiddelen.
13. Microbiologische bestrijding van plantenziekten.
14. Vooruitzichten voor de toekomst.

Hoofdstuk 13 is speciaal voor de plantenziektenkunde van belang. Er wordt hier o.a. melding gemaakt van het onderzoek van A. VAN LUYK over het antagonisme tussen microörganismen en de Pythium-soorten, die grassen en lucerne aantasten (Med. 14 v.h. Phytopathologisch laboratorium „Willie Commelin Scholten" 1938). Nog meer dan WAKSMAN het in zijn boek doet uitkomen, kan deze studie van VAN LUYK, die geschreven is in een tijd toen er nog maar weinig van antagonisme bekend was, worden beschouwd als een der grondleggende werken op dit gebied. Nog een tweede opmerking moge worden gemaakt naar aanleiding van de vermelding van Mc KINNEY in verband met het feit dat „geel mozaïek" zich niet ontwikkelt in een tabaksplant, die reeds door het gewone mozaïek is geïnfecteerd. Niet Mc KINNEY maar THUNG is de eerste ontdekker van dit type van antagonisme.

Veel aandacht is door WAKSMAN geschonken aan de Straalzwammen of Actinomyceten. Hij zelf heeft uit bepaalde soorten van deze familie o.a. Streptomycine en Streptothricine bereid, en aangetoond dat deze stoffen waarde hebben als middelen tegen enkele menselijke ziekten, die niet met penicilline bestreden kunnen worden. Na de verschijning van zijn boek heeft men door *Bacterium tumefaciens* aangetaste planten met penicilline en streptomycine kunnen genezen. Met een andere uit een Actinomyceet bereide stof zijn in de laatste jaren, eveneens in Amerika, veelbelovende sproeiproeven genomen tegen appelschurft.

Ook enkele Fusariumsoorten behoren tot de schimmels, waaruit men in de laatste jaren antibiotica bereid heeft. Of de door VAN KOOT ontdekte antagonistische werking van *Fusarium solani* ten opzichte van voor de Komkommer pathogene Fusaria op de afscheiding van een antibioticum berust, is nog niet bekend.

Het hier besproken boek versterkt de overtuiging dat samenwerking van microbiologen en phytopathologen van groot belang is voor de gezondheidstoestand der cultuurplanten.

H. M. QUANJER